

Joachim Fessler
Diss. Mainz
1903



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555010_0017

Aus der Abteilung für klinische Endokrinologie an der II. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur radioimmunologischen Messung
von Plasma-Glucagon

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der Johannes
Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Joachim Fessler
aus Hamburg

Mainz, 1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Glucagon 1-29, Aminosäuresequenz	1
Physiologie des Glucagon 1-29 und Geschichte der Nachweisttechnik	2
Prinzip der Meßmethode	7
Herstellung der Peptide Glucagon 1 - 12 und 19 - 29	8
Kopplung der Glucagon-Bruchstücke an einen im- munogenen Träger a.) Methode nach Tager	20
b.) Methode nach Saunders	25
Immunisierung	29
Titer Bestimmung	30
Verdrängung und Kreuzreaktivität	32
Diskussion	34
Zusammenfassung	37
Danksagungen	39
Reagenzien	40
Literatur	41
Lebenslauf	48

Glucagon 1 - 29 (1)

N-terminal

His

Ser

Glu

Gly

Thr

Phe

Thr

Ser

Asp

Tyr₁₀

Ser

Lys

Tyr

Leu

Asp

Ser

Arg

Arg

Ala

Glu₂₀

Asp

Phe

Val

Glu

Trp

Leu

Met

Asn

Thr

C-terminal

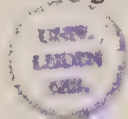
Physiologie des Glucagon 1-29 und Geschichte der Nachweisttechnik

Glucagon 1-29 ist ein Polypeptid-Hormon, das aus 29 Aminosäuren besteht. Es hat ein Molekulargewicht (MG) von ca. 3500 dalton. In seinen Wirkungen auf den Stoffwechsel gleicht es dem Adrenalin, wirkt jedoch nur auf die Leber und nicht auf die Muskulatur. Dem Glucagon 1-29 entsprechen spezifische Bindungsstellen an der Plasmamembran der Zielzellen, mit denen es nach dem Schlüssel-Schloß Prinzip interagiert. Diese Bindungsstellen sind jedoch nicht durch α - bzw. β -Rezeptorenblocker blockierbar, wie die des Adrenalins. Durch Anlagerung an die Membran aktiviert Glucagon 1-29 die Adenylat-Cyclase, die nun ihrerseits als second messenger fungiert und die cytoplasmatische Konzentration von cyclischem AMP erhöht; c-AMP überführt mit Hilfe von aktivierten Protein-Kinasen die Leberphosphorylase β -Kinase in ihre aktive Form und gleichzeitig die Glycogen-Synthetase in die inaktive Form. Die Phosphorylase β -Kinase aktiviert nun ihrerseits die Phosphorylase β , die in ihrer aktiven Form als Phosphorylase α den Glycogenabbau einleitet. Aus dieser Wirkung resultiert die Bezeichnung hyperglycämisch - glycogenolytisches Hormon für Glucagon 1-29 (1, 4).

Ferner fördert Glucagon 1-29 die Gluconeogenese, indem es die Pyruvatcarboxylase und die Fructose-1,6-diphosphatase aktiviert. Im Fettstoffwechsel fördert Glucagon 1-29 einerseits die Fettsäureoxidation der Leber, andererseits fördert es auch die Speicherung von Fettsäuren in Form von Triglyceriden (1,4).

Glucagon 1-29 unterliegt nicht der unmittelbaren Kontrolle der Hypophyse durch ein glandotropes Hormon, vielmehr wird seine Sekretion von der Höhe des Blutzuckerspiegels beeinflusst. Die Sekretion beginnt, sobald der Blutzuckerspiegel den Wert von 80 mg/100 ml unterschreitet (1). Jedoch kann auch Somatotropes Hormon, das in den eosinophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird, die Glucagon-Sekretion anregen (4).

In der Pharmacotherapie soll Glucagon 1-29 bei akuter Herzin-



suffizienz bei gleichzeitiger Überleitungsstörung wirksam sein (5).

Bereits vor der Radioimmunoassay-Ära war bekannt, daß diese Effekte nicht nur durch das in den A-Zellen der Pankreas-Inseln gebildete Hormon ausgelöst werden können, sondern auch durch Extrakte aus Magen-Darm-Gewebe (6) und Blut (7).

Mit den Radioimmunoassays ließ sich nachweisen, daß das immunoreaktive Material des Darmes sich immunochemisch von Glucagon 1-29 unterscheidet. Die gegen Glucagon 1-29 erzeugten Antikörper (AK) ließen sich in zwei Gruppen einteilen, von denen die erste gut mit Material aus Darm und Pankreas reagiert, die zweite jedoch nur sehr schwach mit dem Material aus dem Darm. Daraus wurde ursprünglich abgeleitet, daß die erste Gruppe nicht spezifisch oder kreuzreaktiv, die zweite Gruppe jedoch pankreasspezifisch sei.

Die Arbeiten von Senky (8) und Slusher (9) zeigten jedoch, daß die sogenannten nicht spezifischen Antikörper gegen Glucagon 1-29 gegen eine Determinante im N-terminalen und mittleren Bereich (Aminosäuren 2-23) des Glucagon 1-29 gerichtet sind, die sogenannten spezifischen Antikörper gegen Glucagon 1-29 gegen das C-terminale (Aminosäuren 24-29) Ende des Glucagon 1-29. Angesichts dieser Situation schlug das Nomenklatur-Komitee des internationalen Glucagon Symposiums, Dallas, USA (1976) (10) eine empirische Terminologie für die glucagonähnlichen Polypeptide vor, die sie ihrem Verhalten gegenüber Antikörpern bekannter regionaler Spezifität nach einteilt. Unabhängig davon, wo sie gebildet werden, werden Polypeptide, die mit C- und N-terminalen Antikörpern reagieren, als "Immunoreaktives Glucagon" (IRG) bezeichnet. Solche, die nur mit N-terminalen Antikörpern reagieren, werden mit "Glucagonlike immunoreaktivität" (GLI) bezeichnet. Das ungefähre Molekulargewicht wird der Bezeichnung als Exponent zugefügt.

GLI und IRG lassen sich nun nicht jeweils einer Bildungsstätte zuordnen, da beide sowohl im Pankreas als auch im Darm nachgewiesen wurden (11-17). Weiterhin wurden glucagonähnliche Po-

lypeptide sogar im ZNS der Ratte (18) und des Hundes (19) und in hoher Konzentration in den Speicheldrüsen der Nagetiere (20) nachgewiesen. Ferner konnten beim Menschen A-Zellen im Duodenum (36) und im Magenfundus (37) nachgewiesen werden, so daß man auch beim Menschen neben den A-Zellen des Pankreas weitere Glucagon-Bildungsstätten annehmen muß.

IRG⁹⁰⁰⁰ (11), GLI¹²⁰⁰⁰ (12) und GLI⁸⁰⁰⁰ (12) haben wahrscheinlich keinen mit dem Glucagon 1-29 vergleichbaren physiologischen Effekt auf den Stoffwechsel (23), aber für GLI⁴⁵⁰⁰ wurde gezeigt, daß es an glucagonspezifischen Membranrezeptoren in der Leber bindet, die hepatische Adenylat-Cyclase (14) und die Glycogenolyse aktiviert (15), wenn auch insgesamt schwächer als Glucagon 1-29. Zusätzlich reagiert in der Gamma-Globulin Fraktion (MG 160 000) etwas mit den Antikörpern, was heute als Big-Plasma-Glucagon (BPG) bezeichnet wird und über dessen Funktion verschiedene Theorien bestehen. Eine postuliert nur eine zufällige Strukturähnlichkeit, eine andere eine Interferenz mit der Antikörper Reaktion, eine weitere versteht BPG als an Plasmaprotein gekoppelte Glucagon-Abkömmlinge und eine letzte betrachtet BPG als biosynthetischen Vorläufer von Glucagon 1-29. Bis jetzt gibt es jedenfalls keinen Hinweis, daß BPG eine wichtige Rolle im Stoffwechsel spielt.

In der letzten Zeit haben mehrere Untersuchungen darauf hingewiesen, daß alle glucagonähnlichen Polypeptide einen gemeinsamen biosynthetischen Weg haben und von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen, ein Prinzip, das in der Endokrinologie bereits für mehrere Hormone etabliert ist (23). Aus dem Schweinedarm haben Thim und Moody (21) Glicentin isoliert, ein Polypeptid aus 69 Aminosäuren, in dem die gesamte Sequenz von Glucagon 1-29 enthalten ist. Glicentin könnte dieser gemeinsame Vorläufer sein. Glicentin hat folgende Struktur: GRPP-Lys-Arg-Glucagon(1-29)-Lys-Arg-Hexapeptid, wobei GRPP dem aus dem Schweinepankreas isolierten "glicentin related pancreatic peptide" entspricht. Glucagon 1-29 entspricht demnach Glicentin 33-61. In dieser Arbeit wird die Numerierung derart vorgenommen, daß die Aminosäure Histidin des Glucagon als Nr. 1 gesetzt wird, die bei Glicentin die Nr. 33 ist. Alle Aminosäuren, die am N-ter-

Abb. 1 : Molekulare Struktur der häufigsten glucagonähnlichen Polypeptide modifiziert nach Conlon (23), (46)

Komponente	-31	0;1	29	37	Reaktion mit N-terminale C-terminale	Glucagonähnliche physiologische Aktivität
GLI ¹²⁰⁰⁰ (Glicentin)	H ₂ N	Glucagon	COOH	+	-	-
GLI ⁸⁰⁰⁰	H ₂ N	Glucagon	COOH	+	-	-
GLI ⁴⁵⁰⁰	H ₂ N	Glucagon	COOH	+	-	+
IRG ⁹⁰⁰⁰	H ₂ N	Glucagon	COOH	+	+	-
IRG ³⁵⁰⁰	H ₂ N	Glucagon	COOH	+	+	+
Big Plasma Glucagon MG : ca. 160 000					+	?

minalen Ende des Glucagon 1-29 ansetzten, werden daraus folgend mit minus bezeichnet. Daraus leitet sich dann für Glicentin die Bezeichnung Glucagon(-31)-37 ab. Von aus dem Schweinepankreas isoliertem GLI⁴⁵⁰⁰ wurde ebenfalls gezeigt, daß es die gesamte Glucagon 1-29 Sequenz enthält, und daß es Glucagon 1-37 entspricht (22). Diese und weitere Untersuchungen (13,46) führten zu einem molekularen Model der glucagonähnlichen Polypeptide, das in Abb. 1 modifiziert nach Conlon (23) wiedergegeben wird.

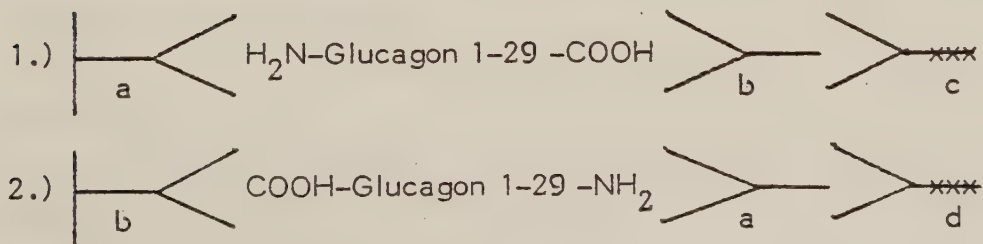
Glucagon ist in der Vergangenheit immer wieder beschuldigt worden, ein diabetogener Faktor zu sein (25,29,30). So wurde bei insulindeprivierten Organismen mit hohem Blutzucker ein ebenfalls hoher Glucagon-Spiegel angetroffen (40,41,44). Die Unterdrückung der endogenen Glucagon-Sekretion durch Somatostatin führt bei diesen Organismen nachfolgend zu einer Normalisierung der Blutzuckerwerte (30,42,43,47). Gibt man dann exogen Glucagon unter Beibehaltung der Somatostatin-Zufuhr hinzu, so steigt der Blutzuckerwert wieder an (29,30,43).

Weiterhin wurde nachgewiesen (24,33,34,35,39,45), daß IRG auch bei total-pankreatektomierten Patienten vorhanden ist, und neben Insulinmangel vielleicht eine weitere Ursache der Hyperglycämie ist. Es konnte gezeigt werden, daß von dem nachgewiesenen IRG 18% IRG³⁵⁰⁰ sind (35), wohingegen andere Autoren (34,45) kein IRG³⁵⁰⁰ fanden. Allerdings fanden einige Autoren bei total-pankreatektomierten Patienten keine Plasma-IRG-Spiegel mehr (31,32). Sie verwandten aber andere Antiseren, was darauf hinweist, daß der Nachweis von IRG von der Art des verwendeten Antiserums abhängt. Ferner konnte nachgewiesen werden, daß IRG-Erhöhungen bei diesen Patienten u.a. durch Arginin-Zufuhr provozierbar sind (24,29,45).

Aus dem bisher gesagten ergibt sich, daß die beschriebenen Glucagon-Antikörper mit mehreren Substanzen reagieren und man über die Höhe an physiologisch wirksamen Hormon keine verlässliche Aussage machen kann (23,45). Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit versucht werden, eine Meßmethode zu erarbeiten, die eine Glucagon 1-29 spezifische Messung gestattet. Hierzu soll ein two-side Radioimmunoassay unter Verwendung von N-terminalen und C-terminalen Antikörpern benutzt werden.

Prinzip der Meßmethode

Der Test beruht auf dem Prinzip, daß zwei verschiedene Antikörper gleichzeitig, einer mit dem C-terminalen und einer mit dem N-terminalen Ende von Glucagon 1-29, reagieren müssen. Zur Erzeugung dieser Antikörper sollen – im Gegensatz zu den meisten bisherigen Versuchen, bei denen das ganze Glucagon 1-29 Molekül auf einen immunogenen Träger gekoppelt wurde – N-terminale und C-terminale Bruchstücke getrennt gekoppelt werden. Damit sollen Antikörper erzeugt werden, die jeweils für die N-terminale oder C-terminale Region spezifisch sind. Zur Durchführung der Messung soll dann einer der beiden Antikörper an einen Träger gebunden werden, zum Beispiel ein Reagenzglas. Er ermöglicht auf diese Weise die Fixierung aller Reaktionspartner an den Träger und die Entfernung aller nicht kreuzreagierenden Substanzen. Daraufhin soll der andere Antikörper hinzugegeben werden, um am bisher nicht besetzten Ende des Hormons zu binden. Dies kann nur erfolgen, wenn die zu messende Substanz beide antigene Strukturen enthält, gegen die die Antikörper erzeugt wurden, wie dies bei Glucagon 1-29 der Fall ist. Der als zweites hinzugegebene Antikörper kann nun spezifisch mit einem radioaktiv markiertem Anti-Antikörper gemessen werden, wenn er sich in seiner Antigenität von dem an den Träger gekoppelten unterscheidet. Dies ist der Fall, wenn er aus einer anderen Tierart stammt. Deswegen sollen die C-terminalen Antikörper im Kaninchen und die N-terminalen Antikörper im Meerschweinchen erzeugt werden. Daraus ergeben sich zwei mögliche Anordnungen der Meßmethode (s. Abb. 2).



a.: N-terminaler Antikörper vom Meerschweinchen

b.: C-terminaler Antikörper vom Kaninchen

c.: markierter Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Antikörper

d.: markierter Anti-Meerschweinchen-Gamma-Globulin-Antikörper

Herstellung der Peptide Glucagon 1-12 und 19-29

Ausgangssubstanz ist kristallines Glucagon 1-29 der Firma Calbiochem, das definiert gespalten wird. Anschließend werden die Spaltprodukte isoliert und identifiziert.

Um ein C-terminales und ein N-terminales Bruchstück von Glucagon 1-29 herzustellen bietet sich das Pankreasenzym Trypsin an, das eine Aminosäurekette hinter Lysin und hinter Arginin spaltet (1). Glucagon 1-29 enthält ein Lysin in 12-Stellung und zwei Arginin in 17 und 18-Stellung, so daß die zu erwartenden Bruchstücke mit 11 bzw. 12 Aminosäuren als Haptene ausreichend lang sind. Da Glucagon 1-29 nur im sauren Bereich $\text{pH} \leq 3$ und im alkalischen Bereich $\text{pH} \geq 9$ löslich ist, das pH-Optimum von Trypsin bei $\text{pH} 7,4$ (1) liegt, ist bei $\text{pH} 9$ eine ausreichende Spaltung zu erwarten.

Die im Handel angebotenen Trypsin Präparationen sollen eine Verunreinigung mit Chymotrypsin haben, die unter einem Prozent liegt. Diese Verunreinigung ist jedoch immer noch groß genug, um die angestrebten Spaltprodukte weiter zu verdauen. Versuche mit diesen Präparationen zeigten dünnschichtchromatographisch zwölf distinkte Fraktionen.

Um die Chymotrypsin - Aktivität auszuschalten wurde die Methode nach Wang (2) gewählt, bei der L-1-Tosyl-Amido-2-Phenyläthyl Chloromethyl Keton (TPCK) eine irreversible Bindung mit dem aktiven Zentrum von Chymotrypsin eingeht (3). Das auf diese Weise hergestellte TPCK-Trypsin ist von der Firma Worthington im Handel und wurde im weiteren verwendet; es liefert die Trypsin spezifischen Spaltprodukte.

Spaltung:

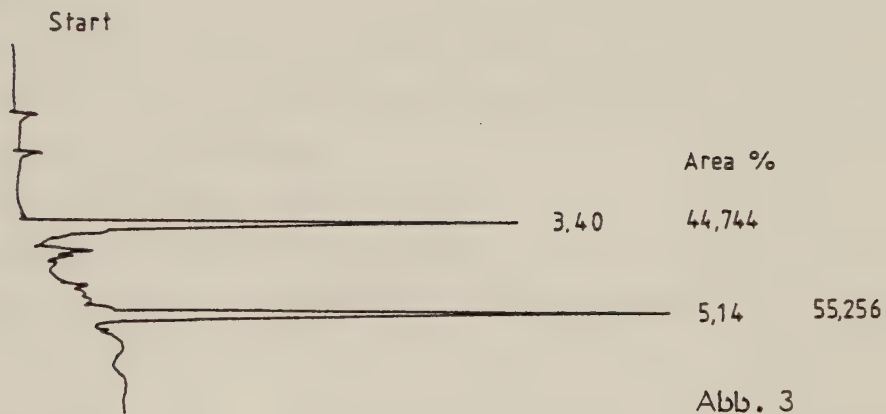
50 mg kristallines Glucagon 1-29 werden in 0,2 ml 0,1 Mol/L NaOH gelöst und mit 5 ml 0,1 Mol/L Triäthylamin-Bicarbonat Puffer $\text{pH} 9$ versetzt. Dann werden 5 mg TPCK - Trypsin (10 000 Einheiten BAEE / mg) hinzugegeben und die Lösung bei 32 Grad Celsius inkubiert. HPLC zeigt nach 3,5 Stunden (s. Abb. 3) eine 45 prozentige Spaltung zwischen Arg(17) - Arg(18) und nach 5 Stunden

(s. Abb. 4) eine 100 prozentige Spaltung. Peak III' entspricht Glucagon 13-17 und Glucagon 13-18, wobei Arg (18) nach 5 Stunden vollständig abgespalten ist, so daß die Fraktion III' homogen ist.

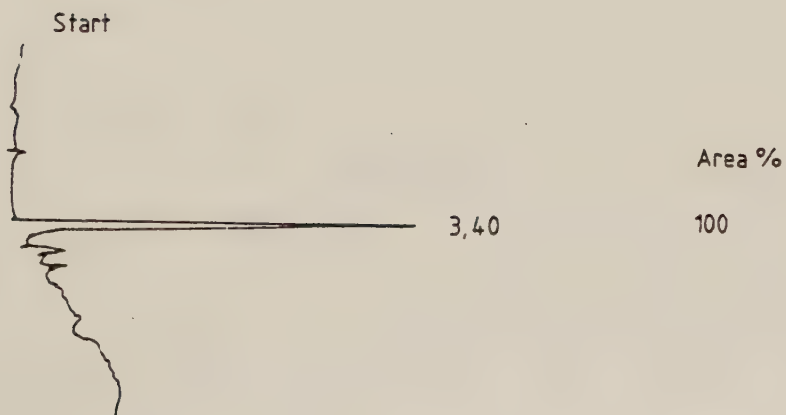
HPLC
Hibar Lichrosorb RP 2 (10 µm) 250 x 4
Lsg. A 1:1 0,1m (NH₄)H₂PO₄ / 0,1m K₂HPO₄
B Acetonitril

% B 5,0
7,0 % B 70,0
Flow 2,0 ml/min
Column P 108
Wavl S:R 280:340

Trypsin digest 3,5h Peak III'



Trypsin digest 5h Peak III'



Isolierung :

Zur Isolierung der gewünschten Bruchstücke werden folgende zwei Verfahren gewählt:

a.) Der Ablauf lässt sich folgendermaßen skizzieren:

Spaltprodukte
Gel-Chromatographie
Ionenaustausch-Chromatographie
Gel-Chromatographie
Identifizierung
Reinheitsanalyse mit HPLC

Der oben beschriebene Ansatz wird nach 5 Stunden am Rotationsverdampfer auf einen ml eingengt; er wird anschließend auf eine Bio Gel P 4 Säule (1,6 x 60) (4 000 dalton) aufgetragen, um Trypsin und Glucagon 13-17 abzutrennen. Als Fraktionsgröße werden 1,5 ml und als Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/10 Min gewählt. Eluent ist 0,1 Mol/L Triäthylamin-Bicarbonat Puffer pH 9, mit dem die Säule zuvor äquilibriert wurde.

Mit denselben Parametern wurden zuvor

1.) 5 mg TPCK-Trypsin (s. Abb. 5) und

2.) 2 mg Glucagon 1-29 (s. Abb. 6) chromatographiert.

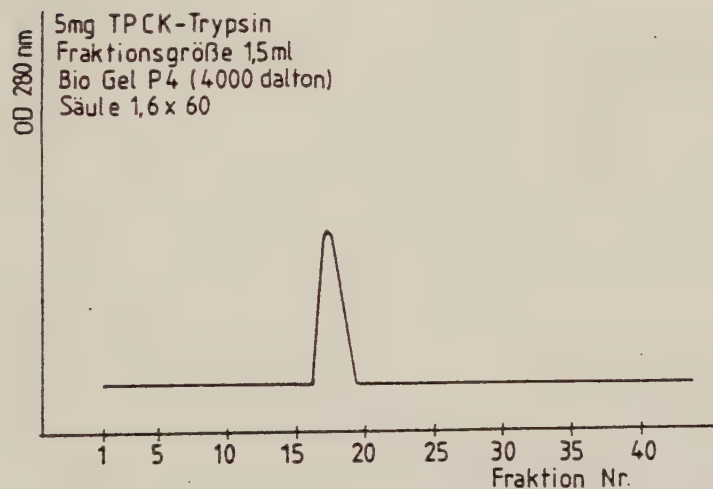


Abb. 5

TPCK-Trypsin erscheint in Fraktion Nr. 17-20, Glucagon 1-29 in Fraktion Nr. 19-22.

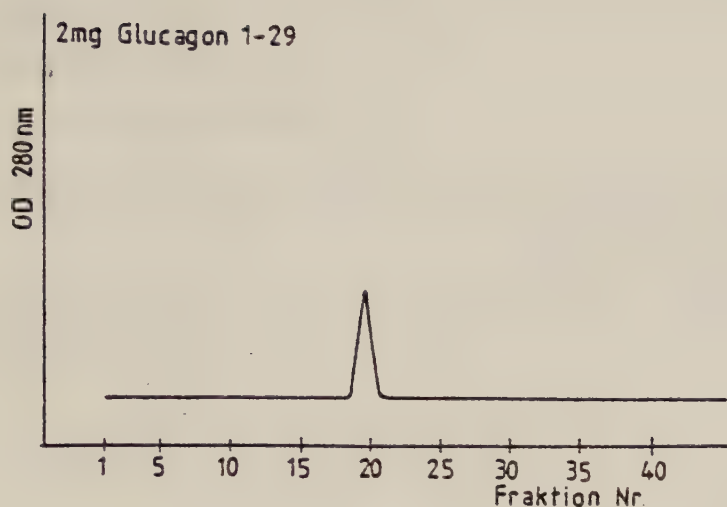
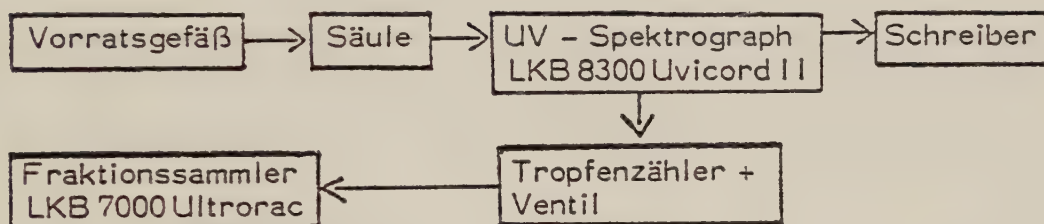


Abb. 6

Versuchsanordnung:



Die Chromatographie zeigt 3 Peaks (s. Abb. 7). Peak I' entspricht

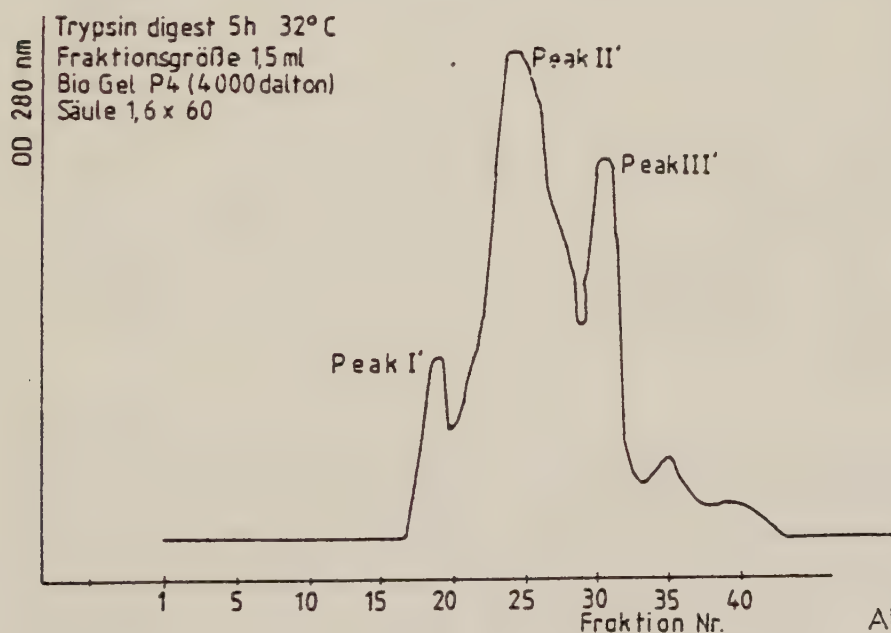


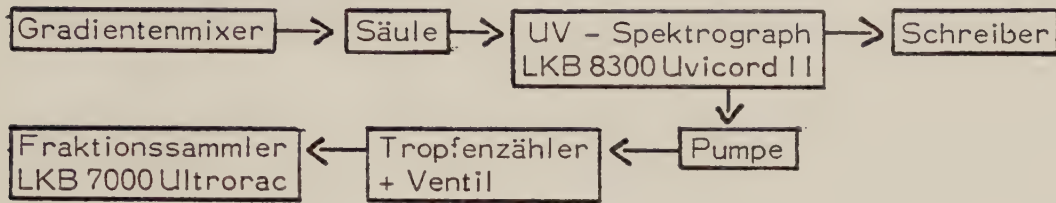
Abb 7

Fraktion 17-20 und enthält somit TPCK-Trypsin (s. Abb. 5);
Peak II' entspricht Fraktion 21-30 und enthält die großen Bruchstücke (MG Glucagon 1-12: 1555, MG Glucagon 19-29 : 1533);
Peak III' entspricht Fraktion 30-33 und enthält Glucagon 13-17, MG 724.

Peak II' wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und in 3 ml 0,03 Mol/L Borat Puffer pH 9,2 gelöst und auf eine DEAE-Sephadex A 25

Säule (1,5 x 25) aufgetragen, die zuvor mit demselben Puffer äquilibriert wurde. Anschließend wird mit einem linearen Salzgradienten (0–1 Mol/L) eluiert.

Versuchsanordnung:



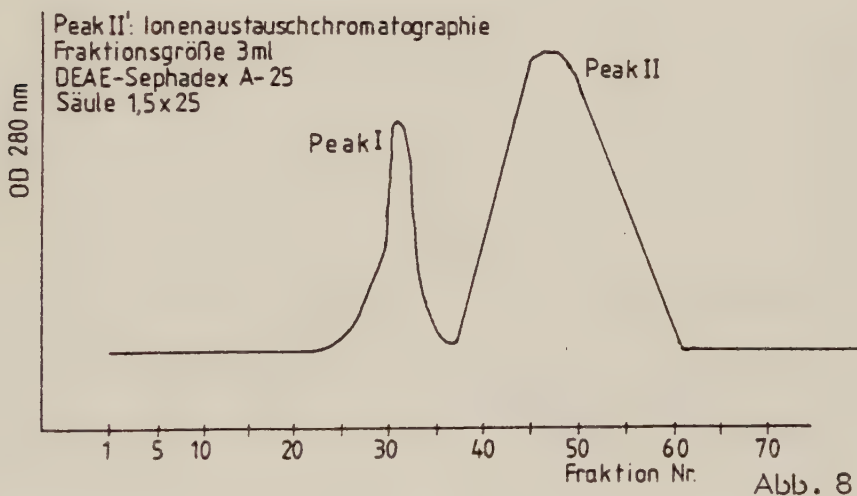
Startpuffer: 0,03 Mol/L Borat Puffer pH 9,2

Ionenstärke 0,135 ; 200 ml

Endpuffer: 0,03 Mol/L Borat Puffer pH 9,2 + 1 Mol/L NaCl/L ,

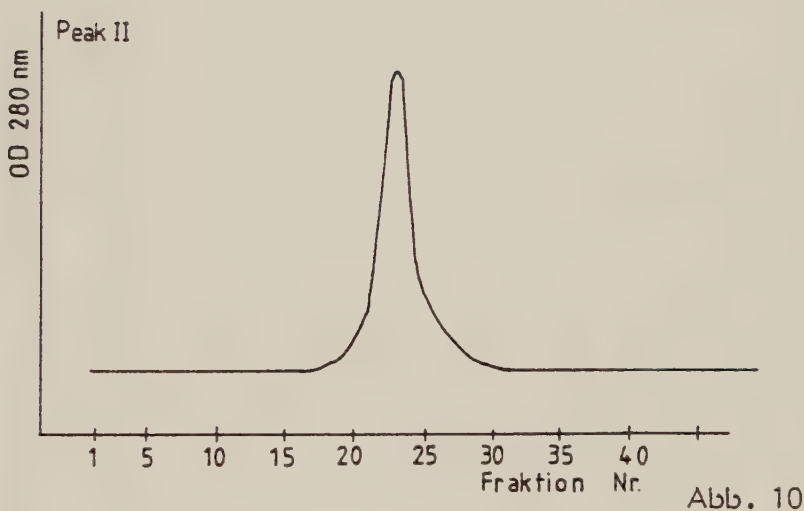
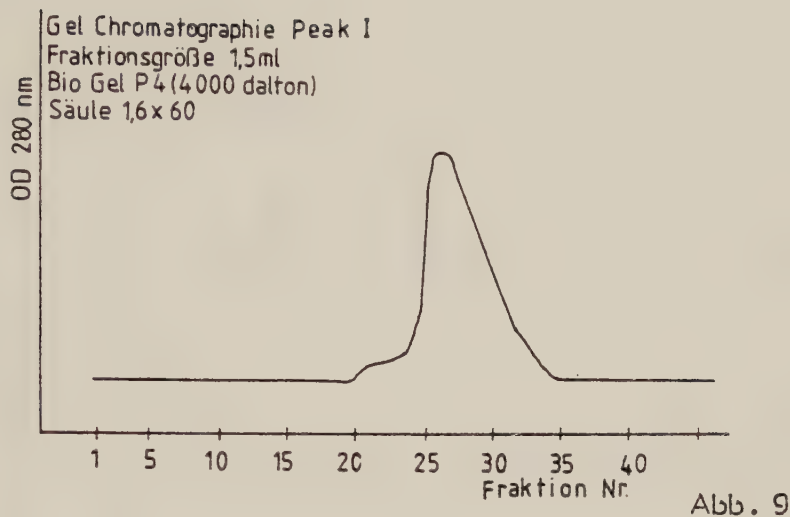
Ionenstärke 0,635 , 200 ml

Als Fraktionsgröße werden 3 ml und als Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/3,3 Min gewählt. Die Chromatographie (s. Abb. 8) zeigt zwei Peaks. Peak I und II werden am Rotationsverdampfer auf einen ml



eingengt und gel-chromatographisch auf Bio Gel P 4 (Bedingungen wie zuvor) entsalzt. Die entsalzten Bruchstücke werden dann am Rotationsverdampfer auf einen ml eingengt und lyophilisiert. Entsalzung von Peak I s. Abb. 9, von Peak II s. Abb. 10.

Insgesamt werden auf diese Art und Weise 260 mg kristallines Glucagon 1–29 verarbeitet. Die Ausbeute beträgt 54 mg Glucagon 1–12, entsprechend 53,24 % und 41,97 mg Glucagon 19–29, entsprechend 41,97 %.



Identifizierung:

Die Bruchstücke werden durch Aminosäurenanalyse mit dem AS-Analysator LKB 4400 identifiziert. Hierzu werden je 0,5 mg der beiden entsalzten Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie und Peak III' der ersten Gel-Chromatographie 24 Stunden bei 110 Grad Celsius in 1 ml 6 Mol/L HCl hydrolysiert, anschließend am Rotationsverdampfer eingengt und in 1 ml Aqua dest. gelöst. Als Vergleich dienen 0,5 mg Glucagon 1-29, die gleichbehandelt werden. Das Ergebnis (s. Tab. 1) identifiziert Peak I der Ionenaustauschchromatographie als Glucagon 1-12 und Peak II als Glucagon 19-29, Peak III' der Gel-Chromatographie als Glucagon 13-17.

Tab. 1 Aminosäurenanalyse. Die Aminosäure, deren Betrag jeweils unterstrichen ist, wird als 1 gesetzt, die Konzentrationen der anderen werden relativ dazu angegeben. Tryptophan geht bei der sauren Hydrolyse verloren. G = Glucagon ; AS = Aminosäure ; eK = erwartete Konzentration

AS	eK	G 1-29	eK	G 1-12	eK	G 19-29	eK	G 13-17
His	1	<u>1</u>	1	<u>1</u>	0	0	0	0
Lys	1	1,21	1	1,45	0	0	0	0,15
Ala	1	1,01	0	0	1	<u>1</u>	0	0,099
Ser	4	3,8	3	3,42	0	0	1	1,3
Glu	3	2,9	1	1,37	2	1,72	0	0,34
Gly	1	1,03	1	1,25	0	0	0	0,26
Thr	3	2,94	2	2,22	1	1,47	0	0,6
Phe	2	1,83	1	1	1	1,04	0	0,23
Asp	4	4,86	1	1,37	2	2,16	1	1,59
Tyr	2	1,97	1	0,914	0	0	1	0,88
Leu	2	2,1	0	0	1	1,09	1	<u>1</u>
Arg	2	1,89	0	0	0	0	1	1,02
Val	1	0,67	0	0	1	0,83	0	0,17
Met	1	0,966	0	0	1	0,58	0	0,16

Bei G 1-12 und G 19-29 werden die Aminosäuren, die eine erwartete Konzentration von 0 haben, nicht ausgedruckt, da ihr Wert für eine Berechnung zu klein ist. Asparagin und Glutamin werden zu ihren Säuren oxidiert.



Die Reinheit beider Peptide wurde mit HPLC bestimmt, einer Methode, die Substanzen entsprechend ihrer Lipophilie trennt. Dazu wird ein Gradient von hydrophil, 10 % Acetonitril in wässriger Lösung nach 100 % Acetonitril gefahren (Daten s. Abb. 11). Die Extinktion wird bei 280 nm gegen 340 nm gemessen. Die ansteigende Lipophilie mit dem gegenüber Wasser geringeren Brechungsindex erklärt den Abfall der Null-Linie (s. Abb. 11 - 13). Jeder Peak erhält den Zeitpunkt seines Auftretens vom Start weg ausgedrückt. Es werden je 1 mg Bruchstücke in 1 ml Aqua dest. gelöst verwendet.

Die Chromatographie mit dem Lösungsmittel (s. Abb. 11) zeigt ein charakteristisches Einspritzartefakt, das im weiteren bei der Reinheitsberechnung abgezogen wird. Glucagon 1-12 (s. Abb. 12) erscheint bei 2,39 Min, Glucagon 19-29 (s. Abb. 13) erscheint bei 6,22 Min. Beide enthalten keinen Anteil vom jeweils anderen, sind also definitiv voneinander getrennt. Sie enthalten eine gemeinsame Verunreinigung bei 5,9 Min, Glucagon 1-12 enthält eine weitere bei 5,27 Min. Die absoluten Flächen der Peaks wurden durch Integration berechnet. Nach dieser Methode zeigt Glucagon 1 - 12 eine Reinheit von 87,3 %, Glucagon 19 - 29 eine von 94,5 %.

Verwendet wurde ein Gerät der Firma Hewlett-Packard 1084 B, und eine Fertigsäule Lichrosorb RP 18 (4 x 125) (5 µm) der Firma Merck.

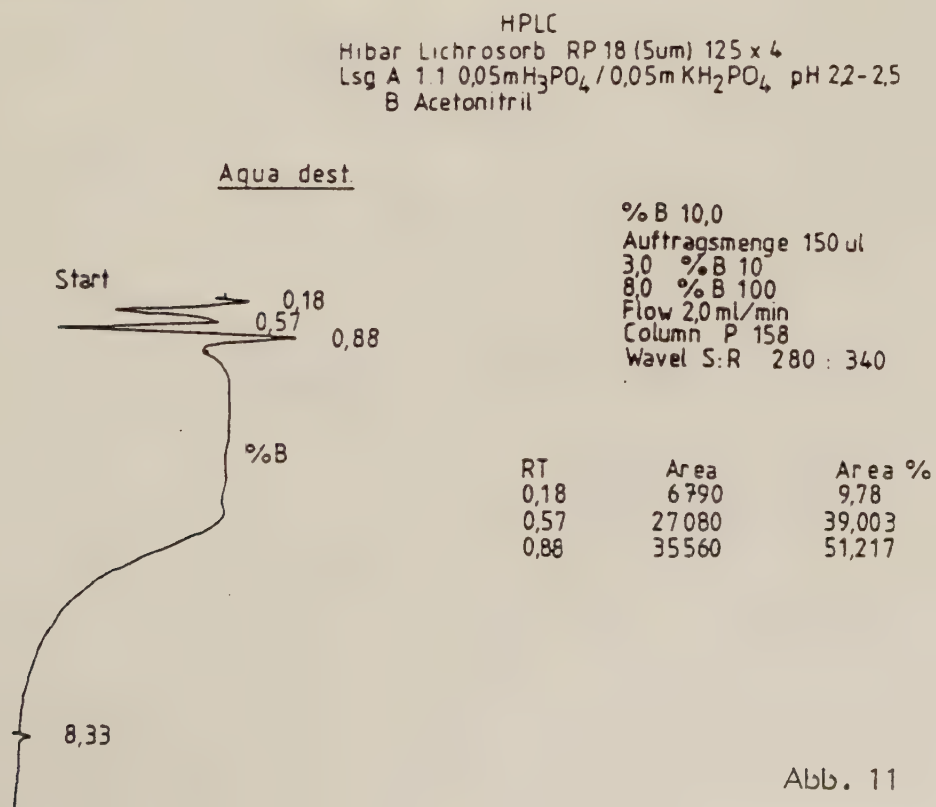


Abb. 11

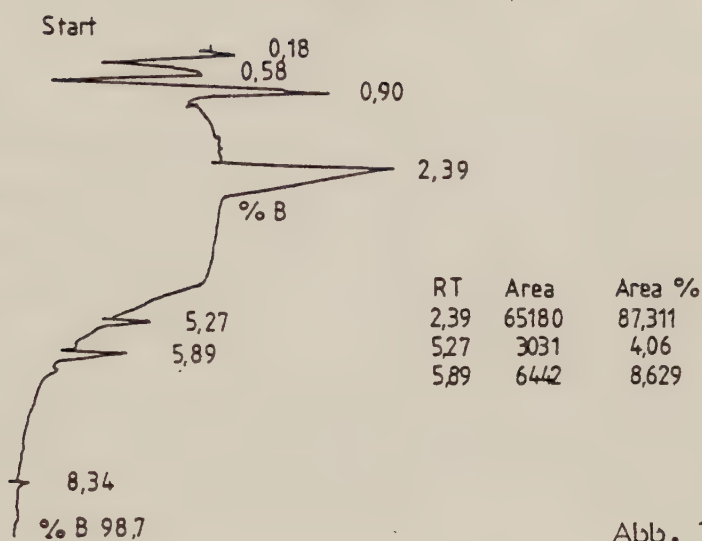
Glucagon 1-12

Abb. 12

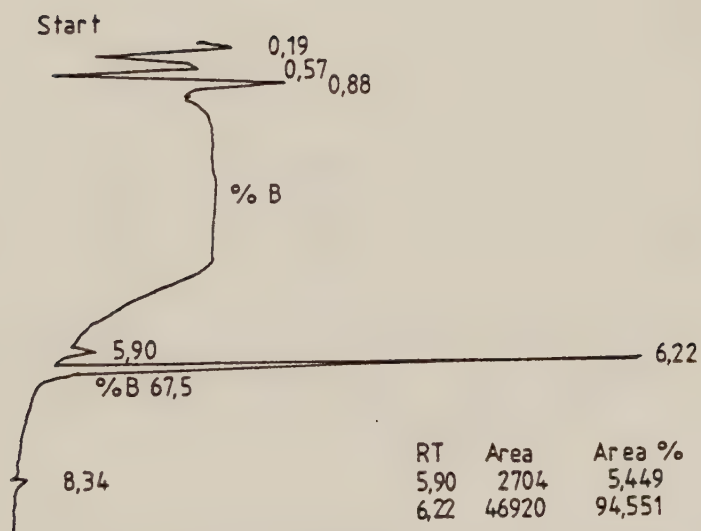
Glucagon 19-29

Abb. 13

b.) Eine weitere Methode, die gewünschten Spaltprodukte zu isolieren, beschreibt Imagawa (26). Sie wird im folgenden etwas modifiziert. Der Ablauf lässt sich folgendermaßen skizzieren :

Spaltprodukte
Fällung
Gel - Chromatographie
Identifizierung

Der oben beschriebene Ansatz wird am Rotationsverdampfer auf einen ml eingengt und anschließend lyophilisiert. Auf das Lyophilisat werden dann 4 ml 0,1 Mol/L Zitrat - HCl Puffer pH 4,0 (Soerensen Puffer) gegeben. Anschließend wird die Suspension 10 Min bei 2400 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und als pH 4 lösliche Fraktion bezeichnet. Das Sediment wird 4 mal mit Soerensen Puffer (2 ml) gewaschen und anschließend in 0,1 Mol/L Triäthylamin-Bicarbonat Puffer pH 9 (2 ml) gelöst und als pH 4 unlösliche Fraktion bezeichnet.

Die pH 4 lösliche Fraktion wird auf eine Bio Gel P 4 Säule (1,6 x 60) (4000 dalton) aufgetragen (s. Abb. 14). Als Fraktionsgrö-

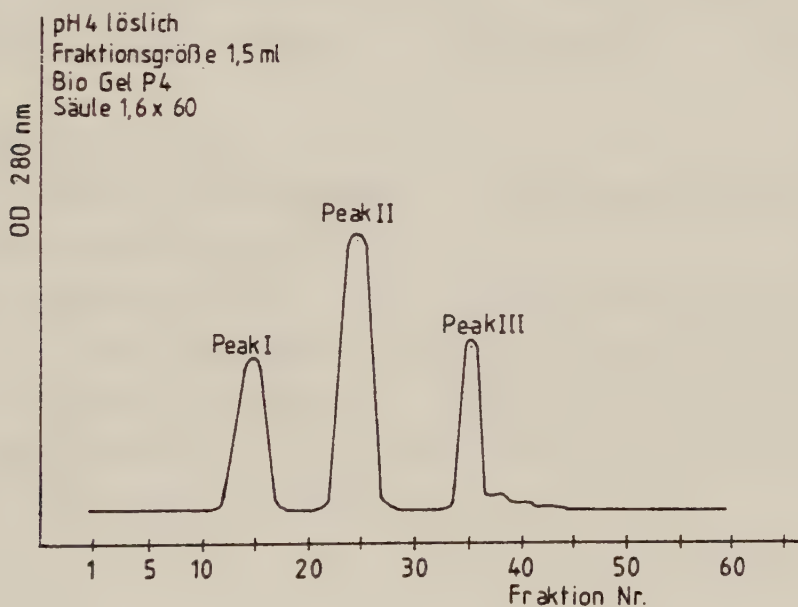


Abb. 14

ße werden 1,5 ml und als Elutionsgeschwindigkeit 1 ml / 10 Min gewählt. Eluent ist 0,1 Mol/L Triäthylamin - Bicarbonat Puffer pH 9, mit dem die Säule zuvor äquilibriert wurde. Entsprechend der Eichung der nach Teil a.) neu gegossenen Säule ist Peak I TPCK - Trypsin, Peak II entspricht einem der gewünschten Glucagon - Bruchstücke und Peak III Glucagon 13-17. Peak II und

Peak III werden am Rotationsverdampfer eingengt und dann lyophilisiert. Die pH 4 unlösliche Fraktion wird auf dieselbe Säule aufgetragen und unter denselben Bedingungen eluiert (s. Abb. 15).

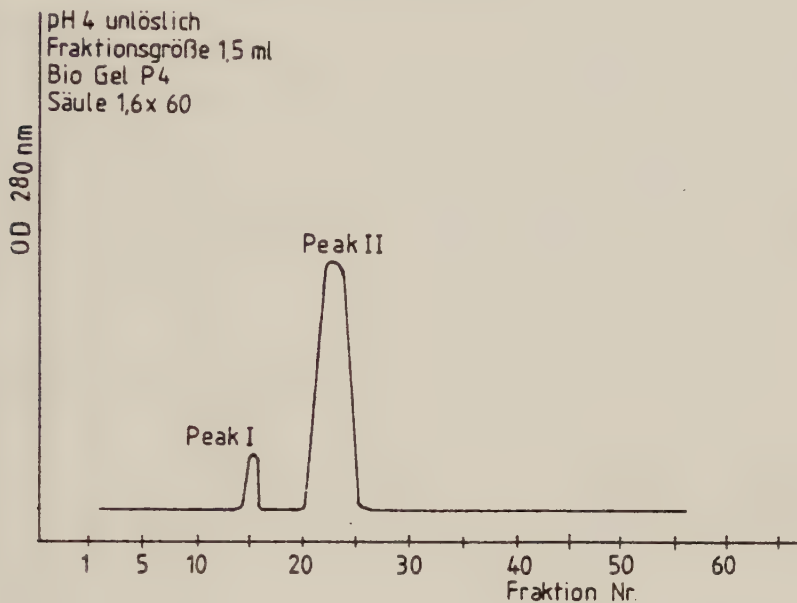


Abb. 15

Peak I entspricht hier wiederum TPCK-Trypsin, Peak II einem der gewünschten Bruchstücke. Peak II wird auf einen ml am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

Identifizierung:

Die Hydrolyse der Bruchstücke zur Aminosäurenanalyse erfolgt wie oben bereits beschrieben.

Das Ergebnis (s. Tab. 2) der Aminosäurenanalyse identifiziert Peak II der pH 4 löslichen Fraktion als Glucagon 1-12 und Peak III derselben als Glucagon 13-17; Peak II der pH 4 unlöslichen Fraktion wird als Glucagon 19-29 identifiziert. Verwendet wurde der AS-Analysator LKB 4400.

Tab. 2 Aminosäurenanalyse. Die Aminosäure, deren Betrag jeweils unterstrichen ist, wird als 1 gesetzt, die Konzentrationen der anderen werden relativ dazu angegeben. Tryptophan geht bei der sauren Hydrolyse verloren. G = Glucagon ; AS = Aminosäure ; eK = erwartete Konzentration

AS	eK	G 1 - 12	eK	G 19 - 29	eK	G 13 - 17
His	1	<u>1</u>	0	0	0	0
Lys	1	1,07	0	0	0	0,2
Ala	0	0	1	<u>1</u>	0	0,03
Ser	3	3,05	0	0	1	1,2
Glu	1	1,32	2	2,08	0	0,19
Gly	1	1,14	0	0	0	0,22
Thr	2	2,26	1	1,06	0	0,23
Phe	1	1,48	1	1,16	0	0,18
Asp	1	1,08	2	1,77	1	0,81
Tyr	1	1,13	0	0,22	1	0,97
Leu	0	0	1	0,99	1	<u>1</u>
Arg	0	0	0	0	1	1,24
Val	0	0	1	0,87	0	0,05
Met	0	0	1	0,46	0	0

Bei G 1-12 und G 19-29 werden die Aminosäuren, die eine erwartete Konzentration von: 0 haben , nicht ausgedruckt, da ihr Wert für eine Berechnung zu klein ist. Asparagin und Glutamin werden zu ihren Säuren oxidiert.

Kopplung der Glucagon - Bruchstücke an einen immunogenen Träger

Die erzeugten Bruchstücke Glucagon 1-12 und Glucagon 19-29 werden zur Immunisierung im Sinne einer Hapten - Immunogen Bindung, wobei die Bruchstücke als Hapten fungieren, jeweils an einen Träger gekoppelt. Hierzu werden zwei Verfahren gewählt.

Einmal werden die Haptene unspezifisch nach der Methode von Tager (27,28) gekoppelt. Unspezifisch bedeutet hier, daß nicht vorhergesagt werden kann, mit welcher reaktiven Gruppe das Hapten an den Träger, in diesem Fall wird Thyreoglobulin gewählt, bindet, sondern daß in statistisch unterschiedlicher Häufigkeit die einzelnen zu Verfügung stehenden reaktiven Gruppen des Haptens an der Bindung zum Träger beteiligt sind.

Die andere Methode wurde von D. Saunders entwickelt. Danach wird Glucagon 19-29 spezifisch mit der N-terminalen Aminosäure Alanin¹⁹ an Rinderserumalbumin gekoppelt.

Beide Verfahren werden nachfolgend beschrieben und die Kopplungsprodukte getrennt zur Immunisierung verwandt.

a.) Methode nach Tager (27,28)

Zur Kopplung wird das bifunktionelle Reagenz 1,5 difluoro-2,4 dinitrobenzol (DFDNB) verwendet. Es entstehen folgende Produkte:

- 1.) (Glucagonyl (1 - 12) - Dinitrophenyl_x)_y - Thyreoglobulin
- 2.) (Glucagonyl (19 - 29) - Dinitrophenyl_x)_y - Thyreoglobulin

Die Kopplung lässt sich in zwei Schritte unterteilen:

- I.) Aktivierung der Haptene mit DFDNB unter Bildung eines Fluoro-dinitrophenyl-haptidyl Derivates (FDNP - Hapten).
- II.) Kopplung des aktivierten FDNP - Haptens an Thyreoglobulin unter Bildung der oben genannten Produkte.

Die folgenden Schritte werden für Glucagon 1 - 12 und Glucagon 19 - 29 jeweils getrennt durchgeführt. Sie finden in einem spitzkonischen Reagenzglas statt, das zuvor mit Silikonlösung benetzt

wurde, die anschließend bei 100 Grad Celsius eine Stunde eingebrannt wurde, um Adhäsionen des Haptens an das Reagenzglas zu vermeiden.

ad. I.) Bei der Aktivierung des Haptens kommt es einmal darauf an, das Hapten vollständig zu entfalten, damit alle vorhandenen reaktiven Gruppen dem Reagenz, hier DFDNB, möglichst ohne sterische Behinderung zugänglich sind. Aus diesem Grund wird das Hapten in 7 Mol/L Guanidin-Puffer gelöst. Ferner soll die Polymerisation des Haptens mit Hilfe des bifunktionellen Reagenzes vermieden werden. Hierzu wird ein ca. 25-facher molarer Überschuß DFDNB verwendet, so daß möglichst alle reaktiven Gruppen des Haptens besetzt werden und damit eine Polymerisation nicht mehr möglich ist.

Ansatz: 20 mg Hapten werden in 0,1 ml 7 Mol/L Guanidin - 0,1 Mol/L Phosphat-Puffer pH 7,2 gelöst. Parallel dazu werden 130 mg DFDNB in 1 ml absolutem Methanol gelöst. Entsprechend der geforderten Volumenrelation (27) 5 Volumen Reagenzlösung zu 1 Volumen Haptenlösung werden sodann 0,5 ml der Reagenzlösung zu der Haptenlösung gegeben. Die Lösung wird gut gemischt und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur (22 Grad Celsius) stehen gelassen. Anschließend wird das nichtverbrauchte Reagenz mit Diäthyläther extrahiert. Hierzu werden 2,4 ml eisgekühlter Äther (4-faches Ansatzvolumen) zum Ansatz gegeben, gut gemischt und dann bei 0 Grad Celsius 5 Minuten bei 2400 g zentrifugiert. Die obere Ätherphase wird abgehoben und verworfen. Dann werden weitere 1,8 ml (3-faches Ansatzvolumen) eisgekühlter Äther hinzugegeben, gemischt und erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert. Nun zeigt sich ein Präzipitat, das die FDNP-Gluca-gonyl-Bruchstücke und die Salze enthält. Der Überstand wird dekantiert und es werden weitere 6 ml (10-faches Ansatzvolumen) eisgekühlten Äthers hinzugegeben, 1 Minute auf Eis stehen gelassen und anschließend dekantiert.

ad II.) Zur Kopplung werden 1 Gramm Thyreoglobulin in 10 ml 0,1 Mol/L Borat-Puffer pH 10 gelöst. Anschließend werden zum aktivierten Hapten 5 ml dieser Lösung gegeben, was 500 mg Thyreoglobulin und bei Einsatz von 20 mg Hapten (MG 1550) einer theoretischen Kopplungsrate von 1:15 entspricht. Die Lösung des Präzipitates erfolgt unter starker Durchmischung rasch und vollständig. Die Lösung bleibt dann 24 Stunden bei Raumtemperatur

stehen, wobei sie die erste Stunde unverschlossen steht, um die Verdunstung von Ätherrückständen zu ermöglichen.

Analyse der Konjugate:

Dinitrophenyl - Derivate haben ein charakteristisches Extinktionsmaximum bei 340 nm (27,28). Von beiden Kopplungsprodukte werden je 0,1 ml auf die oben bereits beschriebene Bio Gel P 4 Säule aufgetragen und mit 0,1 Mol/L Triäthylamin - Bicarbonat Puffer pH 9 eluiert (s. Abb. 16 und 17). Als Fraktionsgröße werden 1,5 ml und als Elutionsgeschwindigkeit 1 ml/10 Min gewählt.

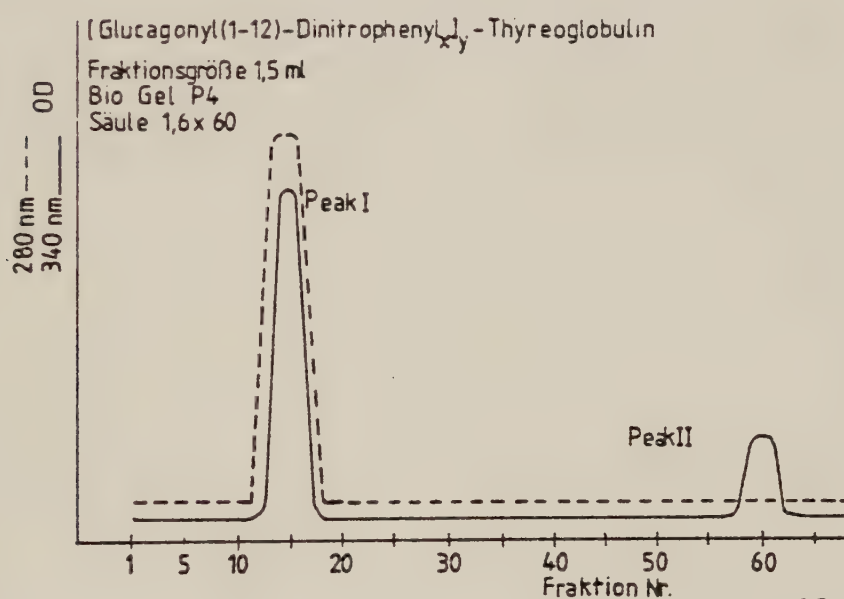


Abb. 16

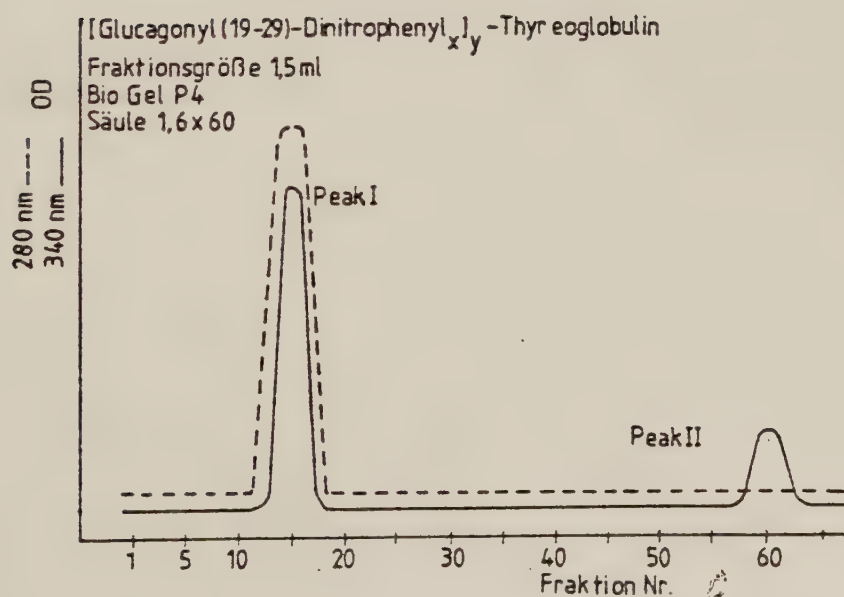


Abb. 17

Die Fraktionen werden bei 280 und 340 nm gemessen. Peak I, der

in der Ausschlußfraktion auftritt, entspricht jeweils den Kopp-
lungsprodukten. Peak II entspricht zurückgebliebenem Reagenz,
das nicht an ein Peptid gekoppelt ist, da sonst bei 280 nm eben-
falls eine Extinktion gemessen werden müßte. Bei Fraktion Nr.
25, wo nichtkonjugiertes Hapten erscheinen müßte, wird weder
bei 280 nm noch bei 340 nm etwas gemessen. Das Hapten ist also
vollständig an Thyreoglobulin gekoppelt.

Zur weiteren Kontrolle wird von Thyreoglobulin (s. Abb. 18) und
von beiden gel-chromatographisch gereinigten Kopplungsproduk-
ten ein Spektrum gemessen. Beide Kopplungsprodukte zeigen im
Vergleich mit Thyreoglobulin bei 320–340 nm eine charakteristi-
sche Schulter, die anzeigt, daß im Proteinkomplex das Dinitro-
phenyl – Derivat vorhanden ist. (Kopplungsprodukte s. Abb. 19)

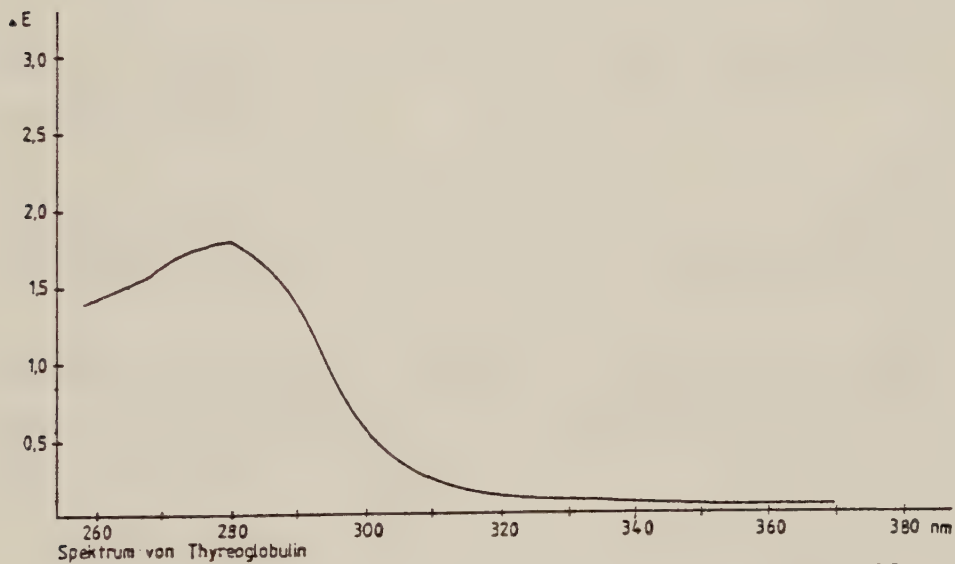


Abb. 18

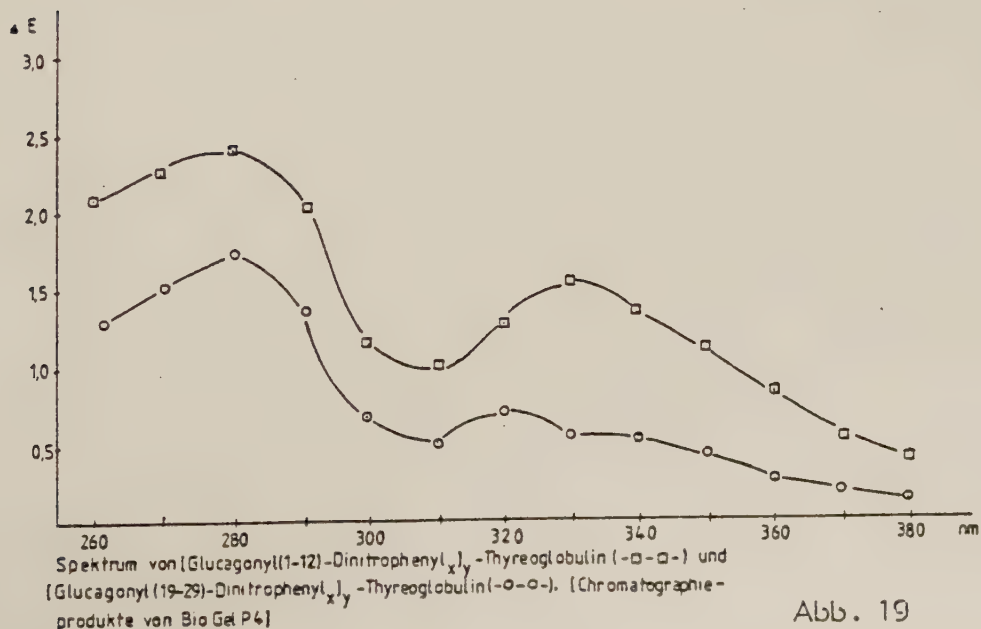
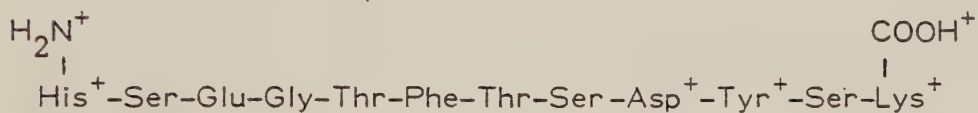


Abb. 19

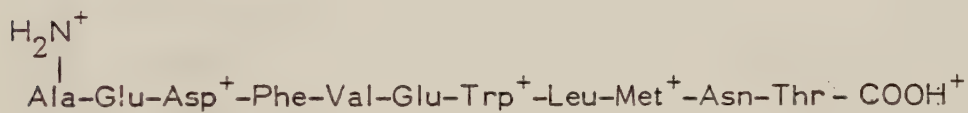
Die Kopplungsrate wird mit Hilfe der Aminosäuren - Analyse bestimmt. Die Hydrolyse der Bruchstücke erfolgt wie oben bereits beschrieben. Bestimmt wird die Zunahme der Aminosäuren Threonin, Thyrosin und Glycin im Kopplungsprodukt im Vergleich zu Thyreoglobulin (49). Es ergibt sich hieraus eine Inkorporation von 10 - 15 Molekülen Glucagon 19-29 pro Molekül Thyreoglobulin und von 12 - 17 Molekülen Glucagon 1-12 pro Molekül Thyreoglobulin.

Entsprechend den mit DFDNB reagierenden Gruppen (27) kann die Kopplung an Thyreoglobulin an folgenden (mit + bezeichnen) Stellen im Glucagon - Bruchstück erfolgt sein :

Glucagon 1-12 :



Glucagon 19-29 :



Hieraus ergibt sich, daß Glucagon 1-12 vor allem terminal, Glucagon 19-29 hingegen im Verlauf der gesamten Kette an Thyreoglobulin gekoppelt sein kann.

b.) Methode nach Saunders

Glucagon 19-29 wird bei dieser Methode spezifisch über seine N-terminale Aminosäure Alanin¹⁹ an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt, so daß im Gegensatz zu der unter a.) beschriebenen Methode ein homogenes Antigen entsteht.

Es entsteht folgendes Produkt:



Der Ablauf der Kopplung ist in Abb. 20 skizziert. Er lässt sich in drei Schritte unterteilen:

- I.) Succinylierung von BSA und Bildung eines aktiven Esters mit p-Nitrophenol
- II.) Einführung der natürlicherweise nicht vorkommenden Aminosäure L-Norleucin in das Peptid Glucagon 19-29 an der Aminosäure Alanin¹⁹
- III.) Kopplung der unter I.) und II.) hergestellten Produkte

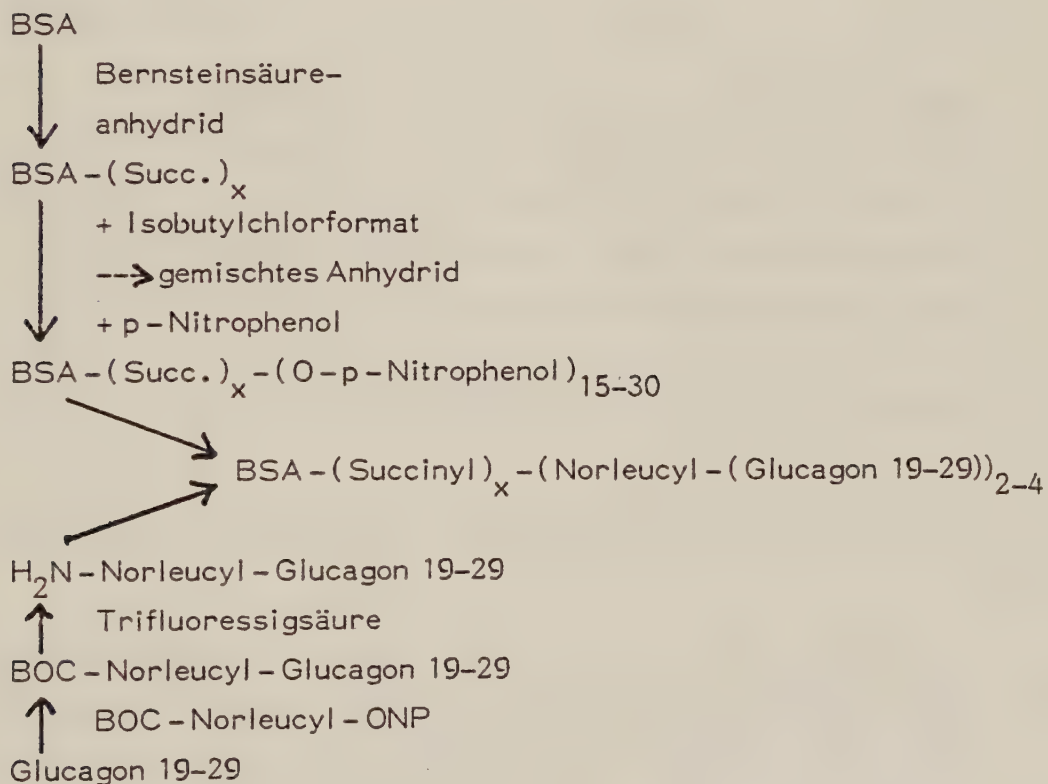


Abb. 20 Spezifische Kopplung von Glucagon 19-29 an Rinder-serumalbumin (BSA). ONP: p-Nitrophenylester
BOC: Butyloxycarbonyl

ad.1) Die Aktivierung des BSA lässt sich in zwei Schritte unterteilen:

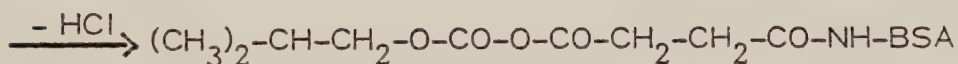
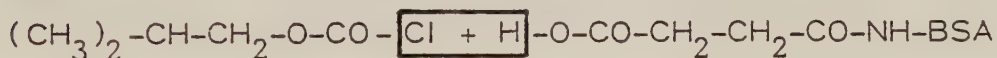
1.) Herstellung von $\text{BSA}-(\text{Succinyl})_x$

2.) Herstellung des p-Nitrophenylesters von $\text{BSA}-(\text{Succinyl})_x$

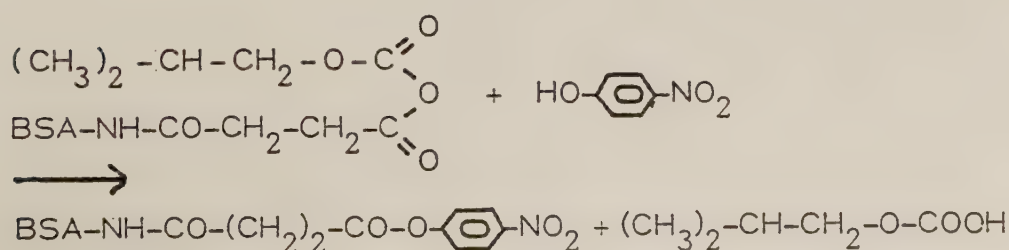
1.) 100 mg lyophilisiertes und dialysiertes BSA der Firma Sigma werden in 10 ml 0,2 Mol/L Borat-NaCl Puffer pH 9,5 gelöst. Parallel dazu werden 650 mg Bernsteinsäureanhydrid in 3 ml Dimethylsulfoxid gelöst und schrittweise über 30 Minuten hinzugegeben. Dabei wird der pH kontinuierlich überwacht und durch tropfenweise Zugabe von 5 Mol/L NaOH zwischen 8,5 und 10 gehalten. Anschließend wird die Lösung weitere 30 Minuten gerührt. Der pH wird dann mit 6 Mol/L HCl auf pH 3 eingestellt; das sich daraufhin bildende Präzipitat wird bei 2400 g 5 Minuten lang abzentrifugiert, einmal mit 5 % Essigsäure und dreimal mit Aceton gewaschen. Es wird anschließend in 2 ml 1 % Triäthylamin gelöst und lyophilisiert.

Produkt: $\text{BSA}-\text{NH}-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH})_x$

2.) 30 mg lyophilisiertes $\text{BSA}-(\text{Succinyl})_x$ werden unter Erwärmung im heißen Wasser in 0,2 ml Pyridin/0,5 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend in einem Eis/Salz Bad auf minus 5 Grad Celsius gekühlt. Sodann werden 0,03 ml Isobutylchlorformat hinzugegeben und es bildet sich das gemischte Anhydrid gemäß:



Nach zwei Minuten werden 20 mg in 0,2 ml Pyridin gelöstes p-Nitrophenol hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das sehr reaktive gemischte Anhydrid zerfällt unter Bildung des p-(Nitrophenyl)_y-(Succinyl)_x-BSA Esters gemäß:



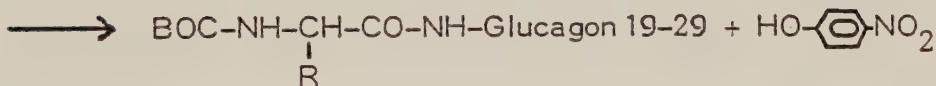
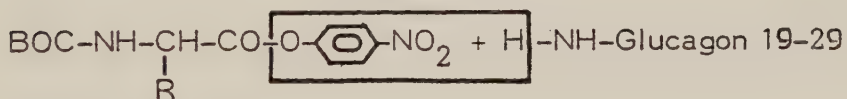
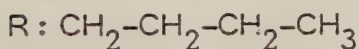
Anschließend wird das Protein mit Aceton präzipitiert, der Niederschlag wird zweimal mit Aceton und einmal mit Äther gewaschen.

Die Anzahl der p-Nitrophenylester Bindungen bestimmt man, indem man ein Aliquot (1 mg) in verdünntem Ammoniak löst und die Extinktion bei 400 nm bestimmt. Das Molekulargewicht von p-(Nitrophenyl)_y-(Succinyl)_x-BSA Ester beträgt ungefähr 70 Kilodalton. Die Konzentration des p-Nitrophenyl-Ions wird unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $2 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ Mol}^{-1}$ (400 nm) berechnet. Es ergibt sich ein Verhältnis von 15–30 Mol p-Nitrophenyl pro Mol BSA-Derivat.

ad II.) Einführung der natürlicherweise nicht vorkommenden AS L-Norleucin in das Peptid Glucagon 19–29 an der AS Alanin¹⁹

5,4 mg Glucagon 19–29 werden in 0,1 ml Dimethylsulfoxid/N-Methyl-Morpholin (100:2) gelöst. 7 mg BOC-L-Norleucin-p-Nitrophenyl Ester (5 Äquivalente) werden hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

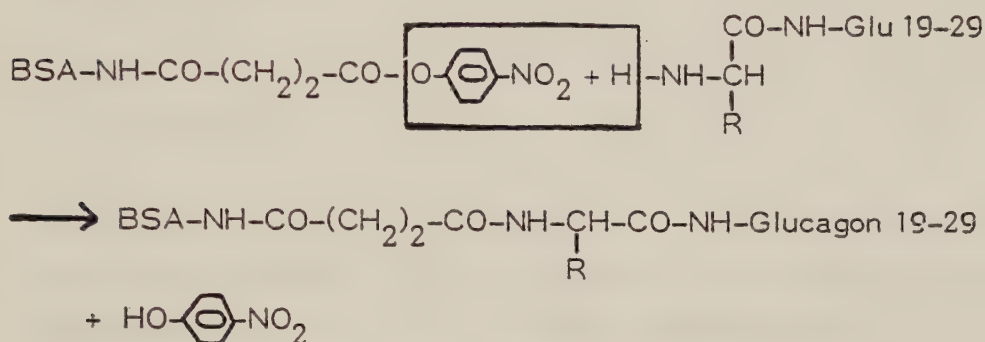
Die einzige im Glucagon 19–29 zu Verfügung stehende Aminogruppe ist an Alanin¹⁹. Sie spaltet den Ester unter Bildung einer Peptidbindung gemäß:



Anschließend wird das Produkt mit Aceton präzipitiert, daraufhin zweimal mit Aceton und einmal mit Äther gewaschen. Mit Hilfe der Aminosäurenanalyse wird eine Inkorporation von 0,8 bis 0,9 Mol L-Norleucin pro Mol Glucagon 19–29 nachgewiesen. Anschließend wird die Schutzgruppe von BOC-L-Norleucyl-Glucagon 19–29 mit 0,5 ml 90 % Trifluoressigsäure bei 0 Grad Celsius über 30 Minuten abgespalten. Das Peptid wird anschließend präzipitiert und mit kaltem Äther zweimal gewaschen. Der Niederschlag wird in 1 ml 1 % Triäthylamin gelöst und lyophilisiert.

ad III.) Kopplung der unter I.) und II.) hergestellten Produkte

Das erzeugte Norleucyl - Glucagon 19-29 wird zusammen mit 25 mg p - (Nitrophenyl)_y - (Succinyl)_x - BSA Ester in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierbei spaltet die Aminogruppe des L - Norleucin, die nun die einzige freie Aminogruppe ist, den Ester unter Bildung einer Peptidbindung gemäß :



R : CH₂-CH₂-CH₂-CH₃

Glu : Glucagon

Um die nicht verbrauchten p - Nitrophenyl - Succinyl Ester Bindungen zu spalten werden 1 ml 2 Mol/L Glycin pH 10 hinzugegeben und die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Protein wird dann mit Aceton präzipitiert und auf Sephadex G 50 f in 50 mMol/L Ammonium - Bicarbonat Puffer chromatographiert. Der dem Albumin - Komplex entsprechende Peak wird lyophilisiert. Die Aminosäurenanalyse zeigt eine Inkorporation von 3,3 Mol L - Norleucin pro 54 Mol Asparaginsäure, das bedeutet 3,3 Mol Norleucyl - Glucagon 19-29 pro Mol BSA.

Herrn Dr. D. Saunders, deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen, danke ich für die Durchführung der oben beschriebenen Kopplung.

Immunisierung

Zur Immunisierung wurden 4 Kaninchen – 2 Bastarde (K 1 und K 2) und 2 Neuseeländer (K 3 und K 4) – und 5 Meerschweinchen – Bastarde (M 1 – M 5) verwandt.

Das Homogenisat, mit dem immunisiert wurde, bestand aus Koppelungsproduktlösung, die im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freund'schem Adjuvans derart homogenisiert wurde, daß eine 1 mg Glucagonbruchstück entsprechende Menge Antigen pro ml Homogenisat enthalten war.

Jedes Tier wurde zur Grundimmunisierung 1mal mit 2 ml Homogenisat paravertebral subcutan gequaddelt (10 Quaddeln). Anschließend wurde es 2mal in 14tägigen Abständen und dann in 4wöchigen Abständen (Kaninchen über 10 Monate, Meerschweinchen über 7 Monate) mit 1 ml Homogenisat paravertebral subcutan zur Boosterung gequaddelt (2 Quaddeln). Zusätzlich erhielt jedes Tier bei der Grundimmunisierung und nach 4 Monaten einen ml Pertussis Stammsuspension zur zusätzlichen Stimulierung des Immunsystems intramusculär injiziert.

K 1 und K 3 erhielten $(\text{Glucagonyl}(19-29)\text{-Dinitrophenyl})_x{}_{10-15}$ -Thyreoglobulin (unspezifisch gekoppeltes C-terminales Glucagonbruchstück als Hapten). K 2 und K 4 erhielten $\text{BSA-(Succinyl)}_x\text{-Norleucyl-(Glucagon } 19-29))_{2-4}$ (spezifisch gekoppeltes C-terminales Glucagonbruchstück als Hapten). M 1 – M 5 erhielten $(\text{Glucagonyl}(1-12)\text{-Dinitrophenyl})_x{}_{12-17}$ -Thyreoglobulin (unspezifisch gekoppeltes N-terminales Glucagonbruchstück als Hapten).

Titerbestimmungen wurden bei den Kaninchen in 4wöchigen Abständen und nach dem Ausbluten durchgeführt; sie wurden bei den Meerschweinchen 1mal nach 3 Monaten und dann nach dem Ausbluten durchgeführt. M 3 verstarb nach 6 Monaten, ohne daß eine zweite Titerbestimmung durchgeführt werden konnte.

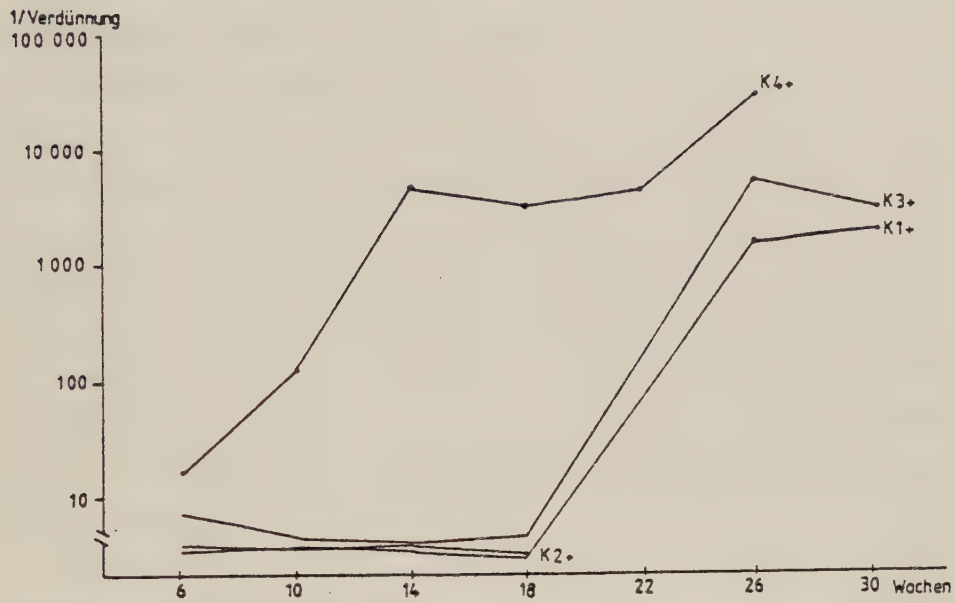


Abb. 21

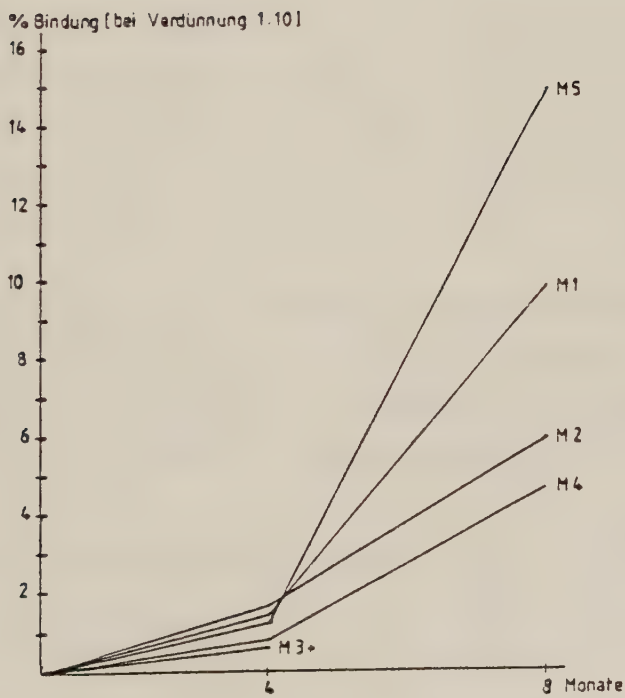


Abb. 22

Titer Bestimmung

Zur Titerbestimmung wird den Tieren aus dem Ohr Blut in eine EDTA-Monovette abgenommen. Das Blut wird dann 10 Minuten bei 2400 g zentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen. Sodann werden Verdünnungsreihen mit 0,05 Mol/L Phosphat-Puffer + 0,1 Mol/L NaCl, pH 7,4 (PBS) + 1 % BSA angelegt. Das BSA wird hinzugegeben, um Adhäsionen der Immunglobuline ans Reagenzglas zu vermeiden. Von jeder Verdünnung werden 0,1 ml genommen. Dazu werden 0,1 ml Trasylol gegeben, um autodigestive Prozesse zu hemmen (48), ferner 0,1 ml 125 J-Glucagon 1-29 und 0,5 ml PBS + 1 % BSA. Dieser Ansatz bleibt 48 Stunden bei + 4-7 Grad Celsius stehen.

Sodann werden 0,1 ml Carrier-Serum (PBS + 24 mg Rinder-Gamma-Globulin pro ml PBS) hinzugegeben, um die Menge des Präzipitates zu vergrößern. Die Immunglobuline werden dann mit 1 ml 20 % Polyäthylenglykol (PEG) gefällt und 30 Minuten bei 2400 g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die Impulse im Präzipitat gezählt (Gerät: NE 1600 Nuclear Enterprises).

Für die Kaninchenplasmen wird anschließend die Verdünnung gegen die prozentuale spezifische Bindung des Tracers aufgetragen und an dieser Kurve die Verdünnung ermittelt, bei der 25 % des Tracers an den Antikörper gebunden sind. Diese Verdünnung wird dann in die Titerverlaufskurve eingetragen (s. Abb. 21).

Da die Meerschweinchenplasmen bei keiner Verdünnungsstufe eine 25 prozentige Bindung des Tracers erreichten, wird für sie die prozentuale Bindung des Tracers bei der Verdünnung 1 : 10 in die Titerverlaufskurve eingetragen (s. Abb. 22).

Abschlußtitel bei 25 % Bindung: K 1: 1:1300
K 3: 1:2100
K 4: 1:17000

Verdrängung und Kreuzreaktivität

Zur Beurteilung der Kreuzreaktivität der gewonnenen Antikörper gegen C-terminales Glucagonbruchstück werden die Antikörper mit Glucagonbruchstück 1-12 versetzt.

Dazu werden 25 mg Glucagon 1-29 mit TPCK-Trypsin gespalten und wie oben beschrieben die Spaltprodukte isoliert und gereinigt, und ein zusätzlicher Reinigungsschritt angeschlossen: Glucagon 1-12 wird in 1 ml 50 mMol/L Ammoniak-Bicarbonat Puffer pH 9 gelöst und auf eine Octyl-Sepharose CL 4B Säule (1,2 x 45) aufgetragen. Sodann wird es mit einem linearen Gradienten von 50 mMol/L Ammoniak-Bicarbonat Puffer pH 9 (Startpuffer) nach 50 % Isopropanol/50 % Startpuffer eluiert (200 ml pro Kammer). Die photometrische Messung zeigt bei 280 nm außer Glucagon 1-12 keinen weiteren Peak. Es werden insgesamt 22 ml gesammelt und die enthaltene Konzentration an Glucagon 1-12 nach der Methode von Waddel (50) bestimmt. Die Konzentration in mg/L berechnet sich wie folgt: (E=Extinktion)

$$(dE_{215 \text{ nm}} - dE_{225 \text{ nm}}) \times 144 \quad \text{mit } dE_{215 \text{ nm}} \text{ kleiner } 1,5$$

Danach ergibt sich eine Konzentration von 268,3 µg/ml Glucagon 1-12. Auf dieselbe Art und Weise wird für Glucagon 19-29 eine Konzentration von 52,56 µg/ml ermittelt (nach der Reinigung (siehe oben) in Aqua dest. gelöst).

Mit jedem der drei Kaninchenantikörper (K1, K3, K4) wird nun bei einer Endverdünnung von K1: 1:1000, K2: 1:2000 und K4: 1:4000 eine Standardkurve mit 0, 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 und 2000 pg/ml Glucagon 1-29 Standard gemessen. Weiter wird Glucagon 1-12 in den Konzentrationen 2 pg/ml, 20 pg/ml, 200 pg/ml, 2 ng/ml, 20 ng/ml, 200 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml und 200 µg/ml gemessen und Glucagon 19-29 in den Konzentrationen 0, 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 und 2000 pg/ml. Dazu werden 0,1 ml 1+3 verdünnter Glucagon 1-29 Tracer mit 0,1 ml Standard oder Glucagon 1-12 oder Glucagon 19-29, 0,1 ml Trasylol, 0,5 ml PBS + 1 % BSA und 0,1 ml Antikörperlösung (K1: 1:100, K2: 1:200, K4: 1:400) für 48 Stunden bei + 4-7 Grad Celsius inkubiert. So-

dann werden 0,1 ml Carrier-Serum (PBS + 24 mg Rinder-Gamma-Globulin pro ml PBS) hinzugegeben und mit 1 ml 25 % Polyäthylenglykol (PEG) gefällt. Das Präzipitat wird 30 Minuten bei 2400 g abzentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und dann die Impulse im Präzipitat gezählt. Sodann wird die prozentuale Bindung des Tracers berechnet, wobei die Bindung des Tracers beim Glucagonstandard 0 pg/ml als 100 % gesetzt wird. Die Verdrängung des Tracers mit Glucagon 1-12 erfolgt zwischen 2 µg/ml und 20 µg/ml Glucagon 1-12 bei allen drei Antikörpern, wohingegen alle drei Antikörper nicht mit dem Glucagon 1-29 Standard reagieren (s. Abb. 23) und nicht mit dem Glucagon 19-29 Hapten (s. Abb. 24)

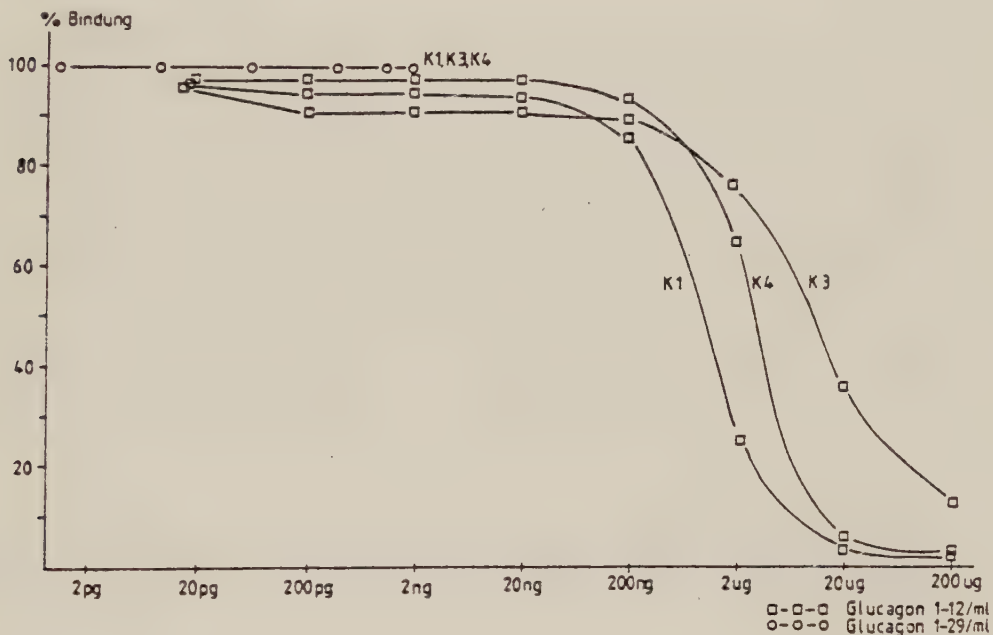


Abb. 23

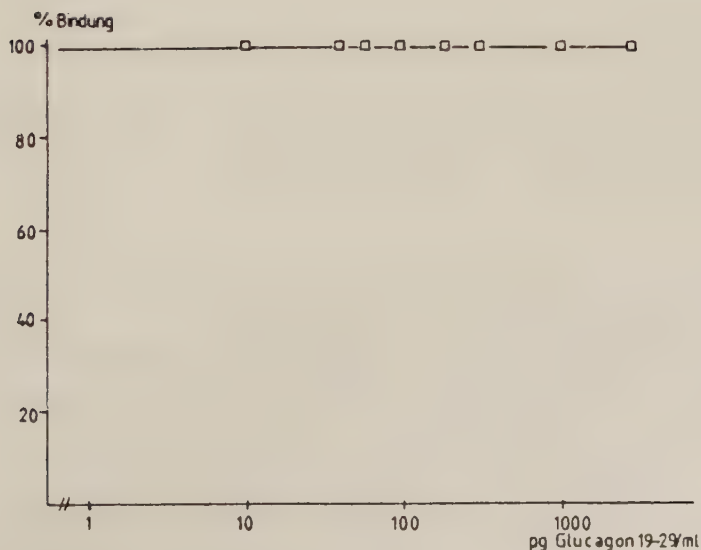


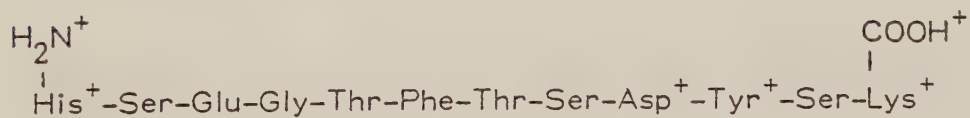
Abb. 24

Diskussion

Im Gegensatz zu bisherigen Kopplungen von Glucagonbruchstücken (Tager, Imagawa) wird in dieser Arbeit Thyreoglobulin als Trägermolekül verwandt, da es immunogener als Rinderserumalbumin (BSA) sein soll. Dasselbe trifft auf die Kopplungsmethode mit Difluorodinitrobenzol zu, die effektiver als z.B. die mit Carbodiimid sein soll (Tager). Die von D. Saunders entwickelte Methode zur Erzeugung eines homogenen, definierten Antigens ist neu und wurde unter der Vorstellung entwickelt, durch ein homogenes Antigen eine Population möglichst homogener Antikörper zu erzeugen.

Die Versuche zeigen, daß es mit der oben beschriebenen Versuchsanordnung möglich ist, Antikörper gegen Bruchstücke von Glucagon 1-29 zu erzeugen. Jedoch waren die Titer der in den Meerschweinchen erzeugten Antikörper gegen das N-terminale Bruchstück des Glucagon 1-29 nicht hoch genug, um mit ihnen eine radioimmunologische Messung vornehmen zu können. Bei den mit C-terminalem Bruchstück immunisierten Kaninchen zeigten sich -unabhängig von der verwendeten Kopplungsmethode- für radioimmunologische Messungen adäquate Titer.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, warum mit dem N-terminalen Bruchstück keine ausreichenden Antikörpertiter erzeugt wurden.



Glucagon 1-12 : die mit Difluorodinitrobenzol reagierenden Aminosäuren sind mit + gekennzeichnet

Abb. 25

Wie oben bereits geschildert, liegen die potentiell mit Difluorodinitrobenzol reagierenden Gruppen bei Glucagon 1-12 (s. Abb. 25) an den beiden terminalen Regionen, so daß das aktivierte Molekül eine Art Dipol bildet. Dadurch sind bei Glucagon 1-12 -Derivat besonders leicht inter- bzw. intramolekulare Vernetzungen möglich, die dann eventuell zum Maskieren der besonders exponierten und damit wahrscheinlich besonders antigenen Struktura-

ren führen.(s. Abb. 26)

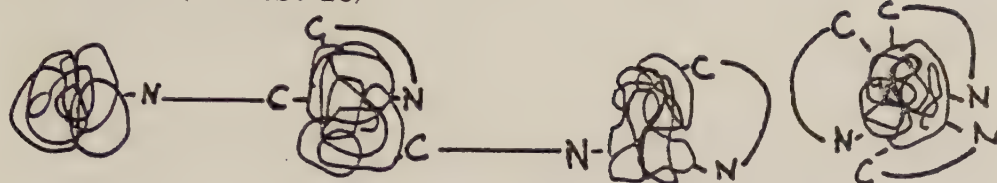


Abb. 26

Beim unspezifisch gekoppelten C-terminalen Bruchstück liegen die potentiell mit Difluorodinitrobenzol reagierenden Aminosäuren über das gesamte Molekül verteilt, so daß es kein strenger Dipol ist und es damit wohl weniger häufig zu inter- und intramolekularen Vernetzungen kommen dürfte. Hier könnte ein Grund liegen, daß die Kopplungsmethode nach Tager nur mit dem C-terminalen Bruchstück zum Erfolg führt.

Bei der Methode nach Saunders kommt es wegen der spezifisch ablaufenden Reaktion nur zur Reaktion einer Gruppe im Bruchstück und somit auch nicht zu intramolekularen Vernetzungen (s. Abb. 27). Ein Hinweis auf die Bedeutung dieser Tatsache ist,

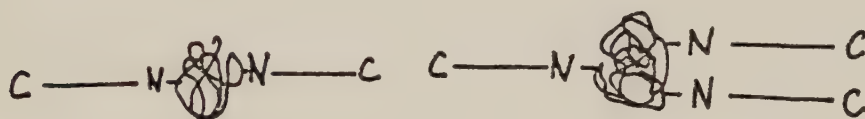


Abb. 27

daß mit der Methode nach Saunders der höchste Antikörpertiter erzielt wurde.

Andererseits liegen die niedrigen Titer gegen N-terminales Glucagon eventuell in der Art des Versuchstiers begründet. Hier können weitere Versuche z.B. mit Schafen oder Ziegen gegebenenfalls zum Erfolg führen

Ein weiteres Problem stellt die Quantifizierung des Einbaus des Haptens in das Trägerprotein dar. Die von Tager praktizierte Methode, mit Tritium markiertes Hapten zu verwenden, ist bei Glucagon bisher nicht möglich, da kein mit Tritium markiertes Glucagon zu erhalten ist. Eine Markierung mit ^{125}I würde die sterischen und elektrischen Eigenschaften des Glucagonbruchstückes derart verändern, daß eine zuverlässige Schlußfolger-

ung auf das Reaktionsverhalten der nicht markierten Moleküle nicht möglich ist.

Das gleiche gilt für die photometrische Bestimmung des eingebauten Difluorodinitrobenzols, da einerseits nicht genau bekannt ist, wieviele Gruppen des Haptens tatsächlich mit Difluorodinitrobenzol reagiert haben, andererseits nicht bekannt ist, inwieweit sich der molare Extinktionskoeffizient durch die Reaktion des Difluorodinitrobenzols in Fluorodinitrobenzol und dann in Dinitrobenzol im Verlauf der Kopplung ändert. Die hier bei der Kopplung mit Difluorodinitrobenzol durchgeführte Quantifizierung mit Hilfe der Aminosäurenanalyse und der Abschätzung der Kopplungsrate anhand der molaren Änderung einzelner, definierter Aminosäuren ist bei Verwendung so großer Moleküle als Trägerprotein wie Thyreoglobulin nur bedingt geeignet, da der Einbau von wenigen Molekülen Hapten und damit die molare Zunahme dieser definierten Aminosäuren im Kopplungsprodukt nur zu einer geringen relativen Änderung der Aminosäurenkomposition führt. Bei kleinen Trägermolekülen ist hierdurch jedoch eine gute Quantifizierung möglich. Die neu entwickelte Methode von D. Saunders bietet hier eine elegante Lösung durch Einbau einer natürlicherweise nicht vorkommenden Aminosäure in das Hapten und der nach der Kopplung erfolgenden Abschätzung des Verhältnisses dieser Aminosäure zu einer im Trägermolekül in großer Anzahl vorkommenden.

Die drei Antikörper K 1, K 3 und K 4 reagieren nun mit dem Glucagon-Tracer, nicht jedoch mit dem Glucagon-Standard und mit dem als Hapten eingesetzten Glucagonbruchstück 19-29. Daß es sich bei den mit dem Tracer reagierenden Substanzen nicht um Antikörper handelt ist ausgeschlossen, da erstens ein Titerverlauf nachweisbar ist, zweitens die Substanzen erwartungsgemäß mit dem Glucagon-Tracer reagieren und sich drittens der entstandene Komplex mit Polyäthylenglykol fällen lässt. Dieses Reaktionsverhalten der Antikörper ist dadurch erklärbar, daß sie auf dem Tracer Strukturen erkennen, die nur auf dem durch den Kopplungsprozeß sterisch etwas veränderten Hapten vorhanden sind, nicht jedoch auf dem Glucagon-Standard und auf dem unveränderten Hapten.

Zusammenfassung

Die Interpretation der Plasmaglucagonspiegel bereitet Schwierigkeiten, da sowohl pankreatisches als auch enterales Glucagon erfaßt werden. Die bisher zur Messung verwendeten Antikörper sind im allgemeinen durch Kopplung des gesamten Glucagonmoleküls erzeugt worden und überwiegend gegen die C-terminale Region des Glucagon 1-29 gerichtet. Diese ist jedoch auch im enteralen Glucagon, in einigen Glucagonabbauprodukten und in Glucagonvorläufern enthalten. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob und wie es möglich ist, einen two-site assay mit einem gegen N-terminales Glucagon und einem gegen C-terminales Glucagon gerichteten Antikörper aufzubauen um damit Glucagon 1-29 spezifisch zu erfassen.

Hierzu werden durch TPCK-Trypsin Verdauung die Glucagonbruchstücke 1-12 und 19-29 erzeugt, isoliert und gereinigt. Glucagon 1-12 wird mit dem bifunktionellen Reagenz Difluorodinitrobenzol unspezifisch an Thyreoglobulin gekoppelt, Glucagon 19-29 wird einmal spezifisch mit einer neuen Methode von D. Saunders über seine N-terminale Aminosäure Alanin¹⁹ an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt und einmal unspezifisch mit Difluorodinitrobenzol an Thyreoglobulin. Unspezifisch bedeutet in dem Zusammenhang, daß man nicht sagen kann, über welche Aminosäure des Haptens die Kopplung erfolgt.

Mit Glucagon 1-12 - Thyreoglobulin werden Meerschweinchen, mit Glucagon 19-29 - BSA und Glucagon 19-29 - Thyreoglobulin werden Kaninchen immunisiert. Die Meerschweinchen zeigen zwar meßbare Antikörpertiter, die jedoch zur Herstellung eines RIAs zu gering sind. Die Kaninchen zeigen zur Herstellung eines RIAs ausreichende Antikörpertiter, wobei der höchste Titer bei dem mit der Methode nach Saunders erzeugten Antigen erzielt wurde. Der Grund für die mangelnde Antikörperbildung der Meerschweinchen könnte in der Eigenschaft des Glucagon 1-12 liegen, nur mit seinen terminalen Regionen mit dem bifunktionellen Reagenz zu reagieren und so die Bildung von intra- und intermolekularen Vernetzungen zu begünstigen. Diese Vernetzungen können dann die antigenen Regionen maskieren. Weitere Versuche mit anderen Kopplungsreagenzien und anderen Versuchstieren, z.B. Schafen

oder Ziegen können hier vielleicht weiterführen.

Die Kaninchenantikörper reagieren wohl mit dem ^{125}J -Glucagon-tracer, der Tracer wird jedoch nicht durch Zugabe eines Glucagon 1-29 Standards bis 2000 pg/ml von seiner Bindung an den Antikörper verdrängt. Dieses Phänomen ist gegenwärtig nicht zu erklären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Danksagungen :

Herrn Prof. Dr. J. Beyer danke ich für die großzügige Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten

Herrn Dr. U. Krause danke ich für die Überlassung des Themas

Herrn Dr. Dr. K. Ehrenthal danke ich für die Hilfe an der HPLC

Herrn Dr. med. vet. H. J. Thimm danke ich für die Unterbringung der Kaninchen und die Anleitung zum Tierversuch

Herrn Dr. D. Saunders danke ich für die spezifische Kopplung des C-terminalen Glucagonbruchstückes an BSA

Herrn Lege und Herrn Nitzgen danke ich für die Hilfe beim Boostern der Kaninchen

Herrn Bender danke ich für die Unterbringung der Meerschweinchen und die Hilfe beim Boostern

Herrn Kalle danke ich für die Aminosäurebestimmungen am LKB 4400

Reagenzien :

Aceton	Merck 8559698
Acetonitril	Merck 17
Ammoniaklösung 25 %	Merck 0045437
Bio Gel P 4	Bio Rad 208333
Borsäure	Merck 70311073
BSA (Rinderserumalbumin)	Behringwerke 225055 A
CO ₂ -Gas	Gaswerke Mainz
DEAE-Sephadex A 50	Pharmazia 17-0180-01
Diäthyläther reinst	Merck 923
1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol	Serva 19520
Freunds' Adjuvans : Bacto Adjuvant complete	Difco 3113-60
Glucagon 1-29	Calbiochem. 300359
Guanidiniumchlorid	Merck 4220
HCl	Merck 9970
Isopropanol:	Merck 9634
125 J-Glucagon 1-29	Serono C. 326
Methanol	Merck 6009
Methanol absolut	Merck 6012
NaCl	Merck 8529251
Natriumhydrogenphosphat	Merck 9030648
NaOH	Merck 9956
Octyl-Sepharose CL-4B	Pharmazia 17-0790-01
Pertussis Stammsuspension	Behring Institut 1315/1316
Polyäthylenglykol (PEG)	Serono 115-20001-2
Silikonlösung	Serva 35130
Thyreoglobulin (Rind)	Sigma T 1001
TPCK-Trypsin	Worthington 31 D 882
Trasylol	Bayer 48763
Triäthylamin	Merck 808352
Zitronensäure 1-hydrat	Merck 9618526

Literatur :

- 1 Lehninger, A.L. (1979)
 Biochemie
 Verlag Chemie , Weinheim, New York, 2.Auflage

- 2 Wang, S.S.; Carpenter, F.H. (1965)
 A compositional assay for insulin applied to a search for
 proinsulin
 The Journal of Biological Chemistry, Vol. 240, No. 4, 1619-25

- 3 Schoellmann, G.; Shaw, E. (1963)
 Direct evidence for the presence of histidin in the active cen-
 ter of chymotrypsin
 Biochemistry, Vol. 12, No. 2: 252-255

- 4 Buddecke, E. (1977)
 Grundriß der Biochemie
 Walter de Gruyter, Berlin, New York, 5. Auflage

- 5 Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. (1977)
 Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
 Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich, 2. Auflage

- 6 Sutherland, E.W.; de Duve, C. (1948)
 Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic
 factor of the pancreas
 J. Biol. Chem. 175 : 663-674

- 7 Makman, M.H.; Makman, R.S.; Sutherland, E.W. (1958)
 Presence of a glucagon-like material in blood of man and dog
 J. Biol. Chem. 233 : 894-899

- 8 Senyk, G.; Nitecki, D.E.; Spitler, L.; Goodman, J.W. (1972)
 The immune response to glucagon in conjugated form
 Immunochemistry 9 : 97-110

- 9 Assan, R.; Slusher, N. (1972)
Structure function and structure immunoreactivity relationships of the glucagon molecule and related synthetic peptides
Diabetes 21 : 843-855
- 10 Unger, R.H. (1976)
Glucagon Symposium: Report of the nomenclature committee
Metabolism 25 (suppl. 1): ix
- 11 Srikanth, C.B.; McCorkle, K.; Unger, R.H. (1977)
Properties of immunoreactive glucagon fractions of canine stomach and pancreas
J. Biol. Chem. 252 : 1847-1851
- 12 Conlon, J.M.; Murphy, R.F.; Buchanan, K.D. (1979)
Physiochemical and biological properties of glucagon-like polypeptides from porcine colon
Biochim. Biophys. Acta 577 : 229-240
- 13 Tager, H.S.; Markese, J. (1979)
Intestinal and pancreatic glucagon-like polypeptides
J. Biol. Chem. 254 : 2229-2233
- 14 Bataille, D.; Freychet, P.; Rosselin, G. (1974)
Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell membranes: Binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase
Endocrinology 95 : 713-721
- 15 Holst, J.J. (1977)
The interactions of the glucagon receptor of liver cell membranes with pancreatic and gut type glucagon
In : Foa, P.P.; Bajaj, J.S.; Foa, N.L. (eds.)
Glucagon, its role in physiology and clinical medicine
Springer, Berlin, Heidelberg, New York : 287-303
- 16 Srikanth, C.B.; Unger, R.H. (1976)
Evidence for the presence of glucagon-like immunoreactivity (GLI) in the pancreas
Endocrinology 99 : 1655-1658

- 17 Larsson, L.I.; Holst, J.; Hakanson, R.; Sundler, F. (1975)
Distribution and properties of glucagon immunoreactivity in
the digestive tract of various mammals: an immunohistochemical
and immunochemical study
Histochemistry 44 : 281-290

- 18 Loren, I.; Alumets, J.; Hakanson, R.; Sundler, F.; Thorell,
J. (1979)
Gut-type glucagon immunoreactivity in nerves of the rat brain
Histochemistry 61 : 335-341

- 19 Conlon, J.M.; Sampson, W.K.; Dobbs, R.E.; Orci, L.; Un-
ger, R.H. (1979)
Glucagon-like polypeptides in canine brain
Diabetes 28 : 700-702

- 20 Lawrence, A.M.; Tan, S.; Hojvat, T.S.; Kirsteins, L. (1977)
Salivary gland hyperglycemic factor. An extrapancreatic source
of glucagon-like material
Science 195 : 70-72

- 21 Thim, L.; Moody, A.J. (1981)
Porcine proglucagon (glicentin)
Diabetologica 21 : 336 abstract

- 22 Tager, H.S.; Steiner, D.F. (1973)
Isolation of a glucagon containing peptide: primary structure
of a possible fragment of proglucagon
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 2321-2324

- 23 Conlon, J.M. (1980)
The glucagon-like polypeptides - Order out of chaos ?
Diabetologia 18 : 85-88

- 24 Krause, U.; Thiel, M.; Beyer, J.; Mangold, G.; Cordes, U.
(1980)
Glucagon secretion in four duodenopancreatectomized patients
after arginin and glucose load
Horm. Metab. Res. 12 : 364-369

- 25 Müller (1978)
Diabetes mellitus, eine bihormonale Krankheit ?
Deutsche med. Wschr. 103 : 1219-1221

- 26 Imagawa, K.; Tomoyoshi, N.; Shin, S.; Uehata, S.; Hashimura, E.; Yanaihara, C.; Yanaihara, N. (1979)
Production of anti-glucagon sera with a C-terminal fragment of pancreatic glucagon
Endocrinol. Japon. 26 (1) : 123-131

- 27 Tager, H.S. (1976)
Coupling of peptides to albumin with difluorodinitrobenzene
Analytical Biochemistry 71: 367-375

- 28 Schmidt, J. (1982)
Untersuchungen zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid
Dissertation Mainz

- 29 Lefebvre, P.J.; Luyckx, A.S. (1979)
Glucagon and diabetes : a Reappraisal
Diabetologia 16 : 347-354

- 30 Dobbs, R.E.; Sakurai, H.; Sasaki, H.; Falcona, G.; Valverde, J.; Baetens, D.; Orci, L.; Unger, R.H. (1975)
Glucagon role in the hyperglycemia of diabetes mellitus
Science 187 : 544-547

- 31 Barnes, A.J.; Bloom, S.R. (1976)
Pancreatectomized man : a model for diabetes without glucagon
Lancet 1 : 219-221

- 32 Gerich, J.E.; Karam, J.H.; Lorenzi, M. (1976)
Diabetes without glucagon
Lancet 1 : 855

- 33 Bringer, J.; Mironze, J.; Marchal, G.; Pham, T.; Luyckx, A.; Lefebvre, P.; Orsetti, A. (1981)

Glucagon immunoreactivity and antidiabetic actions of somatostatin in the totally duodenopancreatectomized and gastrectomized human.

Diabetes 30 : 851-856

- 34 Villanueva, M.D.; Hedo, J.A.; Marco, J. (1976)
Plasma glucagon immunoreactivity in a totally pancreatectomized patient
Diabetologia 12 : 613-616

- 35 Boden, G.; Master, R.W.; Palmer, J.P.; Lobe, T.E.; Owen, O.E.; Rezvani, I.; (1980)
Glucagon deficiency and hyperaminoacidemia after total pancreatectomy
J. Clin. Invest. 65 : 706-716

- 36 Sasagawa, T.; Kobayashi, S.; Fujita, T. (1974)
Electron microscope studies on the endocrine cells of the human gut and pancreas. A cell biological approach
Fujita, T. and Shoin, I. (eds.), Tokyo : 17-38

- 37 Munoz-Barragan, L.; Rufener, C.; Srikant, C.B.; Dobbs, R.E.; Shannon, W.A.Jr.; Baetens, D.; Unger, R.H. (1977)
Immunocytochemical evidence for glucagon containing cells in the human stomach
Horm. Metab. Res. 9 : 37-39

- 38 Foa, P.P. (1976)
Discussion
Metabolism 25 (Suppl. 1) : 1489

- 39 Werner, P.L.; Palmer, J.P.; Seattle, M.D. (1978)
Immunoreactive glucagon responses to oral glucose, insulin infusion and deprivation, and somatostatin in pancreatectomized man
Diabetes 27 : 1005-1012

- 40 Gerich, J. (1977)
On the causes and consequences of abnormal glucagon secretion in human diabetes mellitus
In : Glucagon : Its role in physiology and clinical medicine
Foa, P.P.; Bajaj, J.S.; Foa, N.I. (eds.)
Springer, New York, Heidelberg, Berlin : 617-641

- 41 Unger, R.H. (1978)
Role of Glucagon in the pathogenesis of diabetes : the status of the controversy
Metabolism 27 : 1691-1709

- 42 Gerich, J.E.; Lorenzi, M.; Bier, D.M.; Schneider, V.; Tsalikian, E.; Karam, J.H.; Forsham, P.H. (1975)
Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin: evidence for an essential role of glucagon
N. Engl. J. Med. 292 : 985-989

- 43 Raskin, P.; Unger, R.H. (1978)
Hyperglucagonemia and its suppression: importance in the metabolic control of diabetes
N. Engl. J. Med. 299 : 433-436

- 44 Raptis, S.; Hadjidakis, D.; Enzmann, F.; Raptis, A.; Dimantopoulos, E. (1983)
Hemmung der Arginin-stimulierten pankreatischen Glucagon-Sekretion
Münch. med. Wschr. 125, Suppl. 1 : 38-43

- 45 Soybel, D.; Jaspan, J.; Polowsky, K.; Goldberg, I.; Rayfield, E.; Tager, H. (1983)
Differential immunoreactivity of plasma glucagon components in man : studies with different glucagon antibodies
J. Clin. Endocrinol. Metab. 56 (3) : 612-618

- 46 Ghatel, M.A.; Uttenthal, L.O.; Bryant, M.G.; Christofides, N.D.; Moody, A.J.; Bloom, S.R. (1983)
Molecular forms of glucagon-like immunoreactivity in porcine

intestine and pancreas

Endocrinology 112 (3) : 917-923

- 47 Buchs, A.; Märki, F.; Keller, U. (1982)
Effect of somatostatin and two of its analogues on basal and
arginin-stimulated insulin and glucagon secretion in the dog
Regulatory Peptides, 4 : 117-125
- 48 Eisentraut, A.M.; Whissen, N.; Unger, R.H. (1968)
Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma
glucagon and its prevention with trasylol
The American Journal of the Medical Science, Feb. : 137-142
- 49 Spiro, M.J. (1970)
Studies on the protein portion of thyreoglobulin. Amino acid
compositions and terminal amino acids of several thyreoglobulins
The Journal of Biological Chemistry, Vol. 245, No. 21 : 5820-5826
- 50 Waddell, W.J. (1956)
J. Lab. Clin. Med., 48 : 311

Lebenslauf

Ich wurde am 3. September 1957 als Sohn des Dipl. Phys. Dr. rer. nat. Raimund Fessler und seiner Frau Barbara, geb. Bosch, in Hamburg-Harburg geboren. Von 1958-1960 lebte ich mit meinen Eltern in den Niederlanden und von 1960 - 1964 wieder in Hamburg. Am 25. Januar 1961 wurde dort mein Bruder Thomas geboren. 1964 zogen wir nach Curacao, niederländische Antillen, wo ich im gleichen Jahr in die niederländische Grundschule eingeschult wurde. Ab Mai 1966 lebten wir wieder in Hamburg, wo ich die Grundschule 1968 beendete. Nach erneutem Umzug wurde ich dann in Erftstadt-Lechenich im Herbst 1968 ins Gymnasium eingeschult. Im April 1972 kam meine Mutter bei einem Verkehrsunfall ums Leben. Mein Vater schloß im März 1973 eine neue Ehe mit Frau Erika Zinn, geb. Keppeler. Nach bestandenen Abitur der differenzierten Oberstufe 1977 nahm ich zum Wintersemester 1977/78 das Medizinstudium an der Universität Köln auf. Auf Vorschlag der Schule und nach einem Auswahlseminar wurde ich 1978 vorläufig in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen. Die endgültige Aufnahme erfolgte nach dem Sommersemester 1979 nach Gutachten von Herrn Prof. Dr. Kummer, Anatomie, Herrn Prof. Dr. Gaethgens, Physiologie und Herrn Prof. Dr. Dr. Stoffel, physiologische Chemie, alle Köln.

Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im August 1979 wechselte ich nach Mainz, wo ich im August 1980 das erste Staatsexamen und im August 1982 das zweite Staatsexamen ablegte. Famuliert habe ich 4 Wochen beim Betriebsarzt der ROW, Wesseling, Herrn Dr. Stoßberg, 8 Wochen auf der Urologischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Rüsselsheim bei Herrn Dr. Rapp und 4 Wochen in der chirurgischen Abteilung des gleichen Hauses bei Herrn Prof. Dr. Burckhardt. Das praktische Jahr absolvierte ich im Stadtkrankenhaus Rüsselsheim in der Abteilung für Chirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Kempf, in der Abteilung für innere Medizin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. v. Mengden und in meinem Wahlfach Gynäkologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Breinl. Am 19.8.83 war das PJ beendet.

Am 2. Oktober 1981 heiratete ich in Flörsheim am Main Frau Bet-

tina Kilb, Studentin der Medizin. Unsere Tochter Barbara wurde am 8. Januar 1983 geboren.



